

抗リン脂質抗体症候群における
検査方法の標準化と血栓症発症メカニズムの解明

平成 26 年度

熊野 穰

Summary

The antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by two major elements: the presence of autoantibodies, the so-called antiphospholipid antibodies (aPL) and the occurrence of clinical features defined as thrombosis and pregnancy complications. Lupus anticoagulant (LA) is usually grouped in the aPL. LA is an antibody that interferes with one or more *in vitro* coagulation reactions, which are dependent on interactions with protein-phospholipid complexes.

For LA diagnosis, activated partial thromboplastin time (APTT) is widely used as a test for LA screening. APTT reagents are composed of activators, such as silica or ellagic acid, and phospholipids, and APTT reagents with silica are recommended for LA screening because of greater sensitivity. However, the effects of activators on LA activity have not been adequately investigated. In this study, we examined whether an ellagic acid-based reagent was highly sensitive to LA in a low phospholipid condition. Our results showed that the ellagic acid-based reagent was more sensitive to LA than silica-based reagents in a low phospholipid condition and had adequate sensitivity to detect LA. We concluded that the sensitivity of APTT reagents for LA is dependent on phospholipid concentration and not the activator.

The mechanisms by which aPL mediate disease are only partly understood, and it was considered that aPL induces significant increases in TF transcription. However, aPL is heterogenous, and it is likely that more than one mechanism may be involved in causing thrombosis. We examined the effects of aPL on the transcription of tissue factor (TF), thrombomodulin (TM), and syndecan-4 (SDC4) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Intracellular cAMP concentration is shear stress dependent *in vivo*, and cAMP was added to HUVEC in this study. In high cAMP condition, TF transcription level was not increased, and it was considered that TF didn't affect the thrombosis mechanisms in APS patients. On the other hand, TM expression level was significantly decreased, and SDC4 transcription level was not changed. Our results suggest that the mechanisms by which aPL mediate is the transcription level decrease of TM which inhibit the coagulation cascade. In conclusion, the thrombosis mechanism in APS patients could be dependent on not TF but TM transcription level.

略語集

APC : activated protein C

aPL : antiphospholipid antibody

APS : antiphospholipid syndrome

APTT : activated partial thromboplastin time

AT III : antithrombin III

BSA : bovine serum albumin

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CBB : coomassie brilliant blue

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocoline

DOPE : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

FBS : fetal bovine serum

FV : factor V

FVa : activated factor V

FIX : factor IX

FIXa : activated factor IX

FVII : factor VII

FVIIa : activated factor VII

FVIII : factor VIII

FVIIIa : activated factor VIII

FX : factor X

FXa : activated factor X

FXI : factor XI

FXIa : activated factor XI

FXII : factor XII

FXIIa : activated factor XII

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HUVEC : pooled human umbilical vein endothelial cell

ICA : the index for circulating anticoagulant

ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1

PT-INR : prothrombin time international normalized ratio

ISTH : international society on thrombosis and haemostasis

LA : lupus anticoagulant

LPS : lipopolysaccharide

mRNA : messenger ribonucleic acid

NS : not significant

p38 MAPK : p38 mitogen-activated protein kinase

PBS : phosphate buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PL : phospholipid

pNPP : p-nitrophenyl phosphate substrate

PT : prothrombin time

ROC : receiver operating characteristic

rRNA : ribosome ribonucleic acid

RT : reverse transcription

SD : standard deviation

SDC4 : syndecan-4

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

sec : second

SSC : scientific and standardization committee

TAT : thrombin antithrombin III complex

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

TF : tissue factor

TM : thrombomodulin

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1

目次

序論	・ ・ ・ ・ 1
本論	・ ・ ・ ・ 7
第 1 章 APTT 試薬の活性化剤と LA 感度の関係	・ ・ ・ ・ 7
第 2 章 LA による血栓症の発症メカニズムの分子生物学的な解明	・ ・ ・ ・ 8
1) 緒言	・ ・ ・ ・ 8
2) 材料及び方法	・ ・ ・ ・ 19
(1) 使用化学物質	・ ・ ・ ・ 19
(2) IgG 精製方法	・ ・ ・ ・ 20
(3) 精製 IgG の SDS-PAGE	・ ・ ・ ・ 20
(4) 精製 IgG の ELISA による反応性の確認	・ ・ ・ ・ 21
(5) 使用細胞	・ ・ ・ ・ 22
(6) 細胞培養方法	・ ・ ・ ・ 22
(7) 培養細胞の回収方法	・ ・ ・ ・ 22
(8) HUVEC への aPL と LPS 添加によるセカンドヒット理論の検証	・ ・ ・ ・ 23
(9) HUVEC への精製 IgG 添加の培養時間検討	・ ・ ・ ・ 23
(10) HUVEC への cAMP 添加の検討	・ ・ ・ ・ 23
(11) RNA 抽出方法	・ ・ ・ ・ 24
(12) reverse transcription 反応	・ ・ ・ ・ 24
(13) Real Time PCR 反応方法と解析方法	・ ・ ・ ・ 24
(14) 統計解析方法	・ ・ ・ ・ 25
3) 結果	・ ・ ・ ・ 26
(1) IgG 精製の溶出パターン	・ ・ ・ ・ 26

(2) 精製 IgG の SDS-PAGE	・ ・ ・ ・ 27
(3) 精製 IgG の ELISA による反応性の確認	・ ・ ・ ・ 28
(4) Real Time PCR 反応	・ ・ ・ ・ 29
(5) HUVEC への aPL と LPS 添加によるセカンドヒット理論の検証	・ ・ ・ ・ 30
(6) HUVEC への aPL と LPS 添加による TM の発現量変化	・ ・ ・ ・ 31
(7) HUVEC への aPL と LPS 添加による SDC4 の発現量変化	・ ・ ・ ・ 32
(8) HUVEC への精製 IgG 添加の培養時間検討	・ ・ ・ ・ 33
(9) HUVEC への cAMP 添加による TF の発現量の変化	・ ・ ・ ・ 35
(10) HUVEC への cAMP 添加による TM の発現量の変化	・ ・ ・ ・ 37
(11) HUVEC への cAMP 添加による SDC4 の発現量の変化	・ ・ ・ ・ 39
4) 考察	・ ・ ・ ・ 41
総括	・ ・ ・ ・ 50
謝辞	・ ・ ・ ・ 52
引用文献	・ ・ ・ ・ 53

序論

1. 血液凝固反応と臨床検査

血液凝固反応は出血による血液喪失を防ぐための止血機構の中心であり，出血箇所において血漿中の可用性タンパク質であるフィブリノーゲンから不溶性のフィブリンを産生し，止血血栓を形成する．血液凝固反応には様々なタンパク質が関わっており，凝固カスケードとしてその反応を亢進させる (Figure 1)．凝固カスケードに関わるタンパク質は凝固因子と呼ばれ，カスケード上の位置から外因系，内因系，および，共通系の3種に分類される．外因系は外傷などにより血液中に流入した組織因子 (Tissue Factor) を，内因系は血管内皮細胞の傷害による血管壁のコラーゲン露出をトリガーとした反応系と考えられ，更に両方に関わる反応系が共通系と考えられている．¹⁾

凝固系の機能異常による出血の検査には，外因系と共通系のスクリーニングとしてプロトロンビン時間 (PT)，内因系と共通系のスクリーニングとして活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) があり，凝固機能検査として多くの施設で行われている．¹⁾ PT は外因系，APTT は内因系の凝固因子を活性化し，最終的にフィブリノーゲンがフィブリンに変換されて血漿が凝固するまでの凝固時間を測定する検査である．

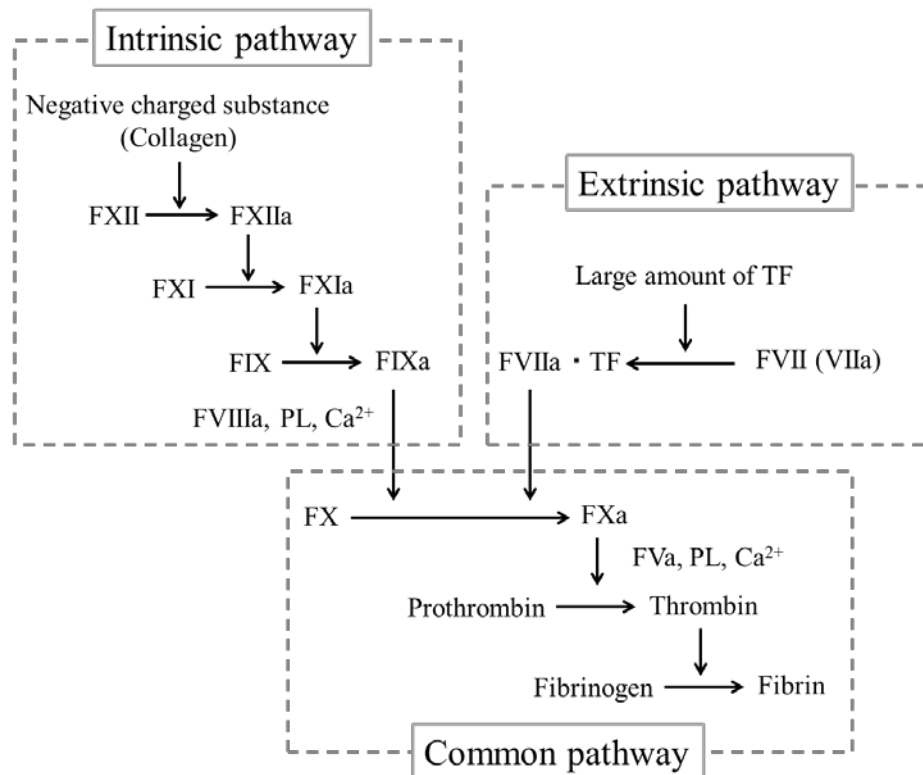


Figure 1. Coagulation pathway (文献 2 より改変)

2. 抗リン脂質抗体症候群におけるループスアンチコアグラント検査方法としての APTT

APTT は血友病などの出血病態の臨床検査として確立されたが、近年では、それ以外の病態の検査にも用いられるようになった。その病態の一つが抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome : APS) である。APS は、血中に抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies : aPL) を有し、動静脈血栓症や習慣性流死産などの臨床症状を呈する疾患群の総称である。本邦においても術後合併症などの原因疾患として注目されている症候群であり、頻度の高い後天性血栓性素因の一つと考えられている。³⁻⁵⁾ aPL には抗カルジオリピン抗体、抗 β 2-glycoprotein I 抗体、および、ループスアンチコアグラント (LA) など様々な抗体がある。抗カルジオリピン抗体はリン脂質であるカルジオリピンとタンパク質の複合体を認識する抗体であり、抗 β 2-glycoprotein I 抗体は陰性荷電を有したプレートと β 2-glycoprotein I のタンパク質の複合体を認識する抗体で、それぞれ酵素免疫測定法 (enzyme linked immunosorbent assay : ELISA) により検出される。一方、ループスアンチコアグラント (LA) はリン脂質依存性凝固時間法で検出される aPL である。LA は「個々の凝固因子活性を阻害することなく、リン脂質依存性の凝固反応を阻害する免疫グロブリン」と定義され、リン脂質膜状での凝固反応を阻害する自己抗体と考えられており、そのスクリーニングには、APTT が広く用いられている。検体中に LA が存在する場合、APTT で亢進されるリン脂質依存性の凝固反応に関わる凝固因子が LA と結合して不活化される。その結果、反応が阻害されて凝固時間が延長する (Figure 2)。LA は血栓症を発症するにも関わらず、APTT の凝固時間延長という出血を意味する検査結果を示す。その理由として、APTT が反応する *in vitro* の系ではリン脂質量が限られているため、LA はリン脂質依存性の凝固反応を阻害して凝固時間延長を示すが、*in vivo* では生体内に血管内皮細胞や血小板の細胞膜を始め無数のリン脂質が存在しているため、LA は無数に起こる凝固反応を阻害せず出血を呈することはないと考えられている。

血栓症のリスクを把握するためには LA に反応性の高い APTT 試薬を用いたスクリーニングを行う必要がある。しかしながら、国内でも多くの APTT 試薬が販売されている中で LA に対する反応性が各試薬で大きく異なり、試薬によって結果が異なることが問題となっている。^{6,7)} 本研究の第 1 章では LA スクリーニングにおいて有用な APTT 試薬の条件と最適なカットオフ値について検討したため、その結果と考察を述べる。

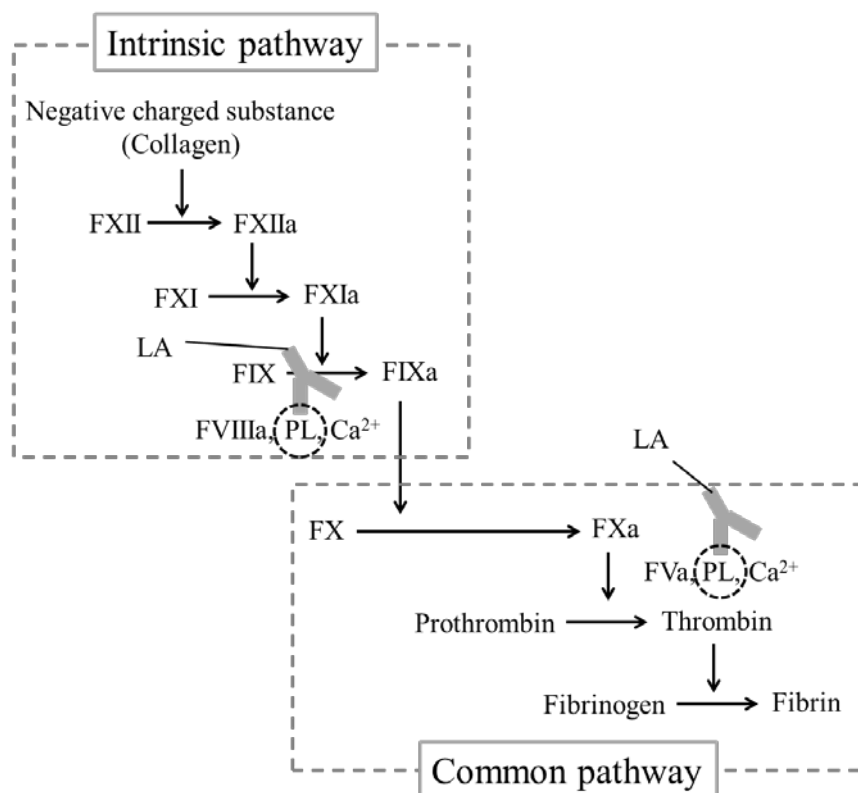


Figure 2. The reaction mechanism of LA in APTT

LA interferes with one or more *in vitro* coagulation reactions such as intrinsic pathway and common pathway, the coagulation reactions are dependent on interactions with protein-phospholipid complexes. The clotting time is prolonged by the interference.

3. LA による血栓症の発症メカニズムの分子生物学的な解明

APS の臨床所見の一つは血栓症であり、凝固亢進である。一方、APS の検査所見の一つである LA は APTT の凝固時間延長という凝固が抑制され出血を意味する結果であり、APS には臨床所見と検査所見の相反する凝固反応が同時に存在するパラドックスがある。その血栓形成機序としては、aPL による単球や血管内皮細胞の凝固活性化、トロンボモジュリン・プロテイン C 系の阻害、トロンビン・アンチトロンビン III 複合体 (TAT) 形成阻害などの報告があるが、⁸⁻¹²⁾ 未だ十分には解明されていない。

本研究では、aPL によって引き起こされる血栓形成機序の一端を解明するために、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Pooled Human Umbilical Vein Endothelial Cell : HUVEC) をモデルとして、aPL 添加時における血管内皮細胞上に存在する凝固関連因子の mRNA 変化を Real Time PCR により検討した。凝固に関連する多くの因子の中で、本研究では特に、組織因子 (Tissue Factor : TF)、トロンボモジュリン (Thrombomodulin : TM)、ヘパラン硫酸

(Syndecan-4 : SDC4) に注目して検討した.

TF は Figure 1 に示したように 外因系に位置する膜貫通型糖タンパク質の凝固促進因子であり, リン脂質成分を有する細胞膜上で活性化凝固第 VII 因子 (FVIIa) と複合体を形成し, 凝固第 X 因子 (FX) を活性化凝固第 X 因子 (FXa) に変換する. FXa は Ca^{2+} , リン脂質, 活性化凝固第 V 因子 (FVa) と複合体を形成し, プロトロンビンをトロンビンに変換する (Figure 3). 生じたトロンビンがフィブリノーゲンをフィブリンに変換し, フィブリンが重合することで止血が行われる. TF の増加はトロンビンの必要量以上の産生を招き, その結果, 血栓形成が促進されると考えられる.

TM は膜貫通型の糖鎖タンパク質であり, トロンビンと複合体を形成し, プロテイン C を限定分解して活性化プロテイン C にする. 活性化プロテイン C (APC) は血中のプロテイン S を補酵素として, 主に活性化凝固第 VIII 因子 (FVIIIa) と活性化凝固第 V 因子 (FVa) を分解して不活化することで凝固を抑制する (Figure 4).¹³⁻¹⁵⁾ SDC4 は膜貫通型糖タンパク質であり, 生成したトロンビンをアンチトロンビン III (AT III) と結合させて不活化するヘパリン様構造を有するプロテオグリカンである (Figure 5).¹⁶⁾

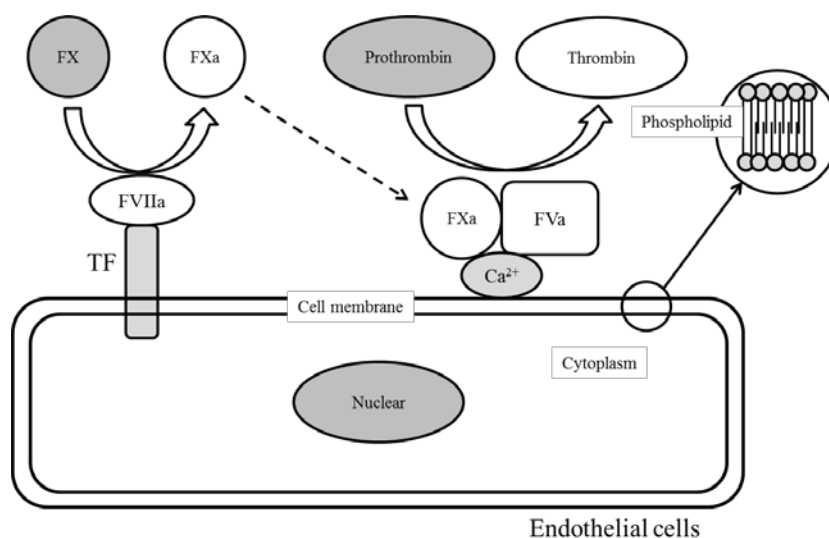


Figure 3. Thrombin generation from the extrinsic pathway

FVIIa bound with TF activates FX, and FXa is generated. FXa converts prothrombin into thrombin in the presence of phospholipid, Ca^{2+} , and FVa. Endothelial cell membranes are worked as phospholipids.

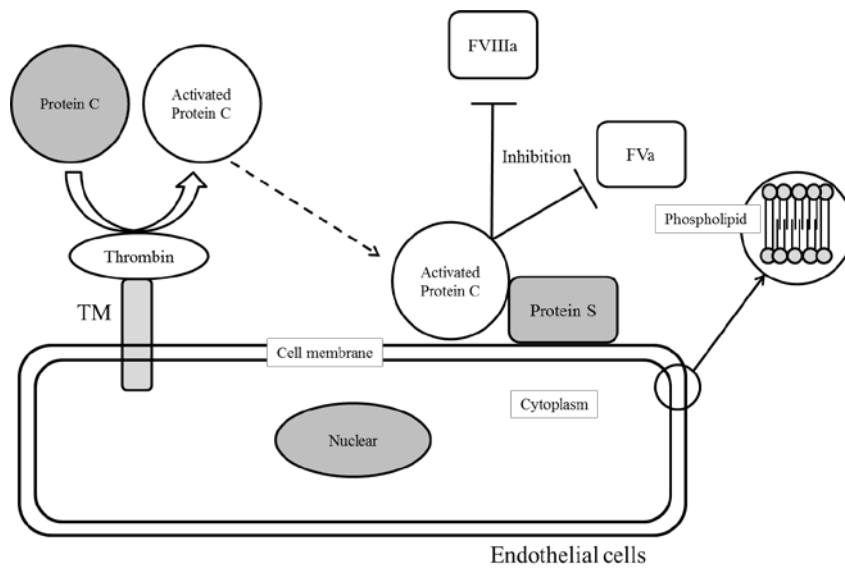


Figure 4. Regulation of coagulation reaction by protein C

Once thrombin binds with thrombomodulin (TM), thrombin will activate protein C. Activated protein C (APC) inhibits FVIIIa and FVa in the presence of its cofactor, protein S. Endothelial cell membranes are worked as phospholipids.

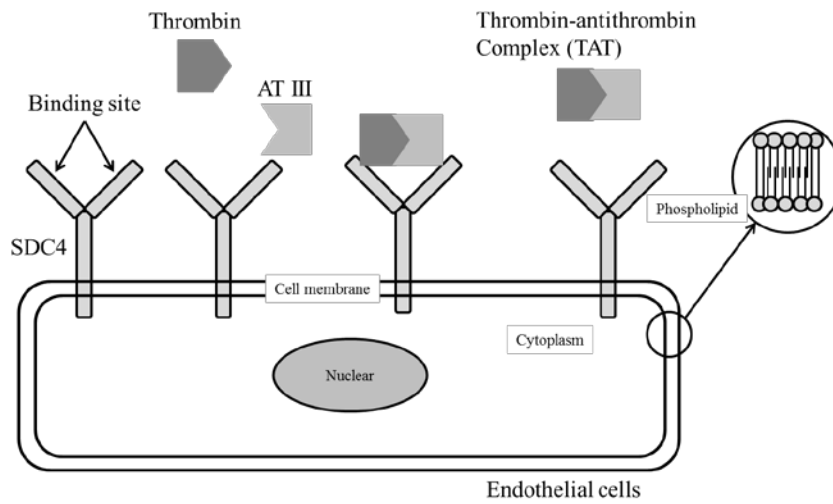


Figure 5. Regulation of coagulation reaction by antithrombin III with Syndecan-4

Syndecan-4 is expressed as proteoglycan protein on endothelial cells. Once thrombin is generated, thrombin binds to SDC4 and makes thrombin- AT III complex (TAT). When TAT is made on SDC-4, thrombin is inactivated.

血管内皮細胞は、その表面に凝固抑制因子である **TM** と **SDC4** を多く発現している。一方で、凝固促進因子である **TF** の発現は最小限に留めており、血管内を抗凝固に保ち、血栓形成による塞栓を防止している。

本研究の第 2 章では、**aPL** として **APS** 患者血漿より精製した **IgG** クラスポリクローナル抗体を用いて、これらの抗体を添加した際の血管内皮細胞上の **TF**, **TM**, **SDC4** の mRNA 発現量の変化から **APS** の血栓形成機序について検討したため、その研究内容について述べる。

本論

第 1 章 APTT 試薬の活性化剤と LA 感度の関係

著作権者の許諾関係上、第 1 章については全文が本学術リポジトリ上の公開ができません。

第 2 章 LA による血栓症の発症メカニズムの分子生物学的な解明

1) 緒言

血栓を形成する凝固カスケードの凝固因子の多くは肝臓で合成され、血液中を流れるタンパク質である。一方、血管内皮細胞上には血液凝固反応を制御するタンパク質が存在し、TF, TM, SDC4 が知られている。

TF は古くから研究されている凝固カスケード中の凝固因子である。序論で示したように TF は細胞膜表面で FVIIa と結合し、FX を FXa に活性化して凝固反応を開始する (Figure 1, 3)。ヒト TF は 263 残基のアミノ酸で構成され、さらに 3 本の糖鎖修飾が全体分子量の 16% を占める 46 kDa の膜タンパク質である (Figure 21)。糖鎖は機能発現には直接関与していないが、細胞内でのプロテアーゼ活性に対する抵抗性などの構造安定化に寄与していると考えられている。⁵⁰⁾

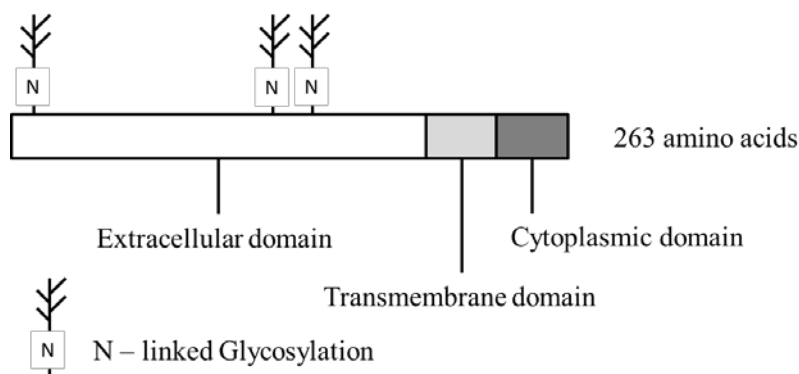


Figure 21. The domain structure of TF

TF is the membrane protein which has extracellular, transmembrane, and cytoplasmic domain. N-linked glycosylation sites are also indicated.

TF は単球, マクロファージ, 内皮細胞, 繊維芽細胞などで tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β , CD-40, セロトニン, ヒスタミン, トロンビン, 酸化 LDL, vascular endothelial growth factor (VEGF) などの刺激により一過性に遺伝子発現が誘導される (Figure 22)。TNF- α や VEGF では protein kinase C が活性化を通じて TF 発現が誘導されることが明らかになっている。⁵⁰⁾ なお, lipopolysaccharide (LPS) の刺激で誘導された mRNA の turn-over は非常に早く, わずか数時間で消失する。^{50 - 52)} 生成された TF タンパク質は糖鎖修飾を受けながら, 細胞内輸送システムによって運ばれる。

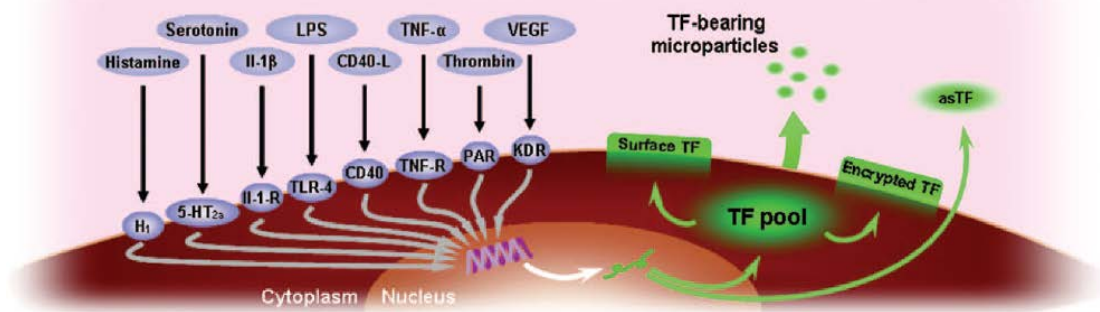


Figure 22. Induction of TF expression and activity (文献 53 より引用)

Various mediators induce TF expression through activation of their receptors. Induction of TF primarily occurs at the transcriptional level, resulting in an increase in TF mRNA and eventually, TF protein expression. TF is distributed in three cellular pools as cytoplasmic TF, surface TF, and encrypted TF.

TF は血管系に富む胎盤，肺，脳あるいは腎臓，肝臓，脾臓等の血管周辺細胞で恒常的に発現し，凝固反応による止血機能を果たす一方で，血管内皮細胞や血液細胞の単球，マクロファージでは血管内外での凝固亢進を通じて感染防御や免疫応答と連動した生体防御反応を担っている。⁵⁴⁾ また，精液や脳髄液中にも TF が存在し，生殖や脳神経機能などとの関連も注目されている．さらに，臨床的には感染症，炎症時の白血球，内皮細胞での TF 発現による凝固亢進，あるいは高脂血症と動脈硬化による頻発する TF 発現と血栓症，血管閉塞の研究も行われている．加えて，白血病とがんに見られるがん化細胞や周辺の浸潤細胞での TF 発現との関連も，抗がん剤の選択や予後の向上を図る上で関心が集まっている。⁵⁵⁾ TF が関係する病態を Table 9 に示す．高血圧や高血糖は TF の発現を誘導して血栓症リスクに繋がること示唆されている。⁵³⁾ 種々の悪性上皮性がんでは 68 ～ 81% の高確率で TF の異常発現が認められ，がん患者で血栓性静脈炎が好発することに，がん細胞由来の TF が関与している可能性がある。^{54, 56)} また，急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia : AML) でも TF の発現亢進が高頻度に現れる．AML の染色体異常が TF に関わる転写因子に影響することで TF の発現亢進が起こると考えられている。⁵⁴⁾ さらに，TF 発現亢進が認められるがん患者と白血病患者では，播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation : DIC) 発症率が高いため，発現亢進した TF が凝固亢進を引き起こすことで DIC を発症すると思われる。

Table 9. The list of TF related diseases

Pathological condition	Cell type	Detail information
Hypertension	monocyte endothelial cell vascular smooth muscle cell ⁵⁴⁾	Angiotensin II induces TF expression through the angiotensin II type I receptor. ⁵⁴⁾
Hyperglycemia	endothelial cell ⁵³⁾	Hyperglycemia induces TF expression through the receptor for advanced glycation end-products and activation of NF-κB. ⁵³⁾
Diabetes	monocyte ⁵³⁾	Diabetes induces TF expression, and TF levels are reduced by improving glycemia control. ⁵³⁾
Arteriosclerosis	monocyte endothelial cell vascular smooth muscle cell macrophage ⁵⁵⁾	Oxidized LDL increases TF expression, and patients with elevated LDL levels display raised TF plasma activity. TF is also detected in foam cells. HMG-CoA reductase inhibitors reduce TF expression. ⁵⁵⁾
Inflammation	monocyte ^{54, 56)}	Cytokines such as TNF-α and interleukins induce expression of TF. ^{54, 56)}
Acute coronary syndrome	vascular cell monocyte ⁵⁴⁾	Plasma concentrations of inflammatory cytokines such as TNF-α and interleukins are increased at the site of coronary artery occlusion, and TF is induced. Several polymorphisms of the TF gene may be associated with a worse outcome in patients with acute coronary syndrome, possibly through increased monocyte TF expression. ⁵⁴⁾
Acute myelogenous leukemia	leukocyte ⁵⁴⁾	Acute myelogenous leukemia induces TF expression for activation of NF-κB. ⁵⁴⁾
Antiphospholipid syndrome	monocyte endothelial cell ¹²⁾	Antiphospholipid antibody induces TF mRNA expression. ¹²⁾

高血圧, 高血糖, がん, 白血病などに加え, APS でも *in vitro* で単球と血管内皮細胞に aPL を添加した場合に TF の mRNA レベルでの発現上昇が認められており, TF 発現上昇による血栓形成機序が報告されている. Ostertag らは HUVEC をモデルとして, aPL 存在下で血管内皮細胞上の TF の mRNA が発現上昇することを示し, TF の発現上昇が APS の血栓形成機序の一旦を担う可能性を示唆した.¹²⁾ しかし, aPL は多様性に富むポリクローナル抗体のため, TF の mRNA の発現上昇は各 APS 患者で挙動が大きく異なる可能性があり, 血栓形成は単一機序によるものではないと推測される. 近年では, aPL の存在下で生体内が血栓傾向となった状態で (first hit), 感染症などをトリガーとして血栓が形成され (second hit), 動静脈血栓症を起こすセカンドヒット理論も提唱されている.⁵⁷⁾ 本章では, aPL が血管内皮細胞に与える刺激について注目し, 血管内皮細胞に発現する TF の mRNA 発現量を測定することで, aPL 存在下で血栓傾向を示すかを既報に従って検証を行った.

TF が凝固亢進に寄与する一方で, TM は凝固抑制に機能する. 血管内皮細胞は凝固因子であるトロンビンを不活化する分子としてその表面に膜タンパク質である TM を発現

している。序論で示したように TM はトロンビンと結合することで、その凝固促進機能を凝固阻害機能へと変換することができる (Figure 4)。TM に結合したトロンビンは、フィブリンからのフィブリン形成、FV と FVIII の活性化、血小板の活性化などの凝固促進機能を失い、Protein C を活性化して凝固を阻害する。これは、血栓形成のために活性化されたトロンビンが、一方で過剰な血栓形成を阻止する目的で凝固反応のブレーキをかけていると考えられている。⁵⁵⁾

TM は 557 残基のアミノ酸で構成される膜貫通型糖タンパク質であり、還元下分子量 105 kDa、非還元下分子量 75 kDa を示す (Figure 23)。また、アミノ末端が細胞膜の外側に露出し、1 回膜貫通型で、カルボキシル末端が細胞質内に露出している。⁵⁸⁾ レクチン様ドメインは細胞の接着に関与し、このドメインを欠失させた変異マウスでは炎症部位に白血球の組織浸潤が多くなり、炎症が加速すると報告されている。^{58,59)} EGF ドメインには EGF 様アミノ酸配列が 6 回繰り返されており、4 番目の EGF 様ドメインはカルシウムを介して Protein C と結合、5 番目が直接トロンビンと結合、6 番目が間接的にトロンビン結合をサポートする。^{58,60)}

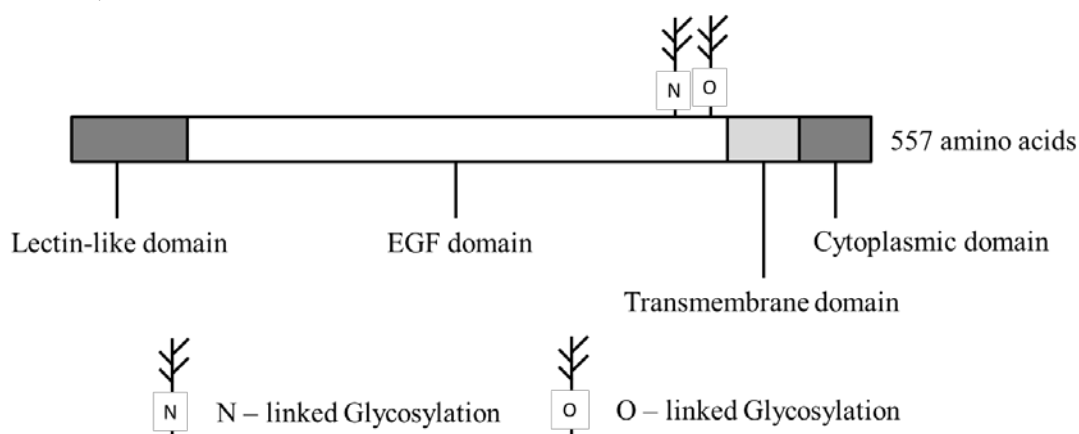


Figure 23. The domain structure of TM

TM is the membrane protein which has lectin-like, EGF, transmembrane, and cytoplasmic domain. N-linked and O-linked glycosylation sites are also indicated.

TM は血管内皮細胞に発現し、ヒトではほとんどの臓器で発現している。各臓器での発現量を組織 1 g あたりで比較した場合、肺が最も多く、次いで胎盤、脾臓、膵臓と報告がある。^{58,61)} 一方、血液が届かない皮膚表皮にもトロンボモジュリンの発現が認められており、凝固抑制以外の機能として生体防御機能を有する可能性が推測される。また、血液中にも全長 TM より分子量の低い TM が存在している。これは血管内皮細胞が傷害を受けて血中に逸脱した分解産物であり、血漿中の TM 濃度の変動は血管内皮細胞傷害の分子マーカー

一として利用されている。⁵⁸⁾ TM が関係する病態を Table 10 に示す。最も研究が進んでいる病態は DIC であり、様々な基礎疾患を有する患者のうち、DIC を発症した患者では血漿中の TM 濃度は発症前と比較して上昇することが報告されている。さらに、DIC 治療で臨床的に改善が認められた場合は濃度が低下し、改善が認められず死亡に至った場合はさらに上昇を示すことも合わせて報告されている。^{58, 62, 63)} TM は DIC 治療薬としても用いられる。近年発売されたリコンビナントの TM が出血症状の改善や凝血的検査値の改善、出血症状に関する有害事象発現率等についても優れていることが示され、現時点で、DIC に対して最も信頼性の高い臨床試験のエビデンスを持つ抗凝固薬として報告されている。⁶⁴⁾

Table 10. The list of TM related diseases

Pathological condition	Cell type	Detail information
Thrombosis	endothelial cell ^{15, 58)}	The most convincing evidence that reduced TM function causes thrombosis is derived from animal studies. Mice expressing only 50% of normal TM function do not develop spontaneous thrombosis, but exhibit enhanced fibrin formation in the lung in response to prolonged hypoxia. ^{15, 58)}
Disseminated intravascular coagulation	endothelial cell ^{58, 62, 63, 64)}	In DIC patients, soluble TM (TM degradation product) is increased. TM is injected to the patients for DIC treatment. ^{58, 62, 63, 64)}
Arteriosclerosis	endothelial cell ¹⁵⁾	Localized loss of TM from endothelium overlaying arteriosclerotic lesions leads to a focal impairment of anticoagulant activation. ¹⁵⁾
Stroke	endothelial cell vascular smooth muscle cell ¹⁵⁾	TM expression in brain capillaries is very low, and might be absent in some regions of the brain. ¹⁵⁾
Cancer	tumor cell ^{15, 58)}	High expression levels of TM in lung, esophagus, or oral squamous cell carcinomas are associated with better-differentiated primary lesions and better survival. Low TM expression in primary breast cancer lesions correlates with a high relapse rate. ^{15, 58)}
Inflammation	monocyte endothelial cell ^{58, 59)}	The Protein C and TM system is a critical modulator for the inflammatory host response to infection. Activated Protein C suppresses cytokine elaboration by monocytes. ^{58, 59)}

TM は凝固抑制に機能する血管内皮細胞上の膜貫通型糖タンパク質であり、DIC を始め様々な病態への関与が指摘されているにも関わらず、APS における血栓症への関与は十分には明確にされていない。本章では、aPL が存在することで TM の発現量が低下して凝固反応を十分に抑制できず血栓傾向となると想定し、mRNA 発現量を測定して血栓傾向になる可能性について検討した。

血管内皮細胞上には トロンبینを介して凝固抑制に機能する TM に加えてアンチトロ

ンビン III を介して凝固抑制に機能するヘパリン様分子である SDC4 が存在する (Figure 5). アンチトロンビン III はトロンビンを始めとした活性化凝固因子と 1:1 で結合してその凝固活性を不活化する. SDC4 はアンチトロンビン III のトロンビンへの親和性を約 1000 倍程度高めて血管内皮上での凝固反応の抑制に寄与している. ⁵⁵⁾

SDC4 は 198 残基のアミノ酸で構成される膜貫通型糖タンパク質である (Figure 24). アミノ末端側に 3 本のヘパラン硫酸が共有結合し, 1 回膜貫通で, カルボキシル末端に 28 残基の細胞内ドメインを有する. CBD ドメインは cell binding domain の略語であり, 血管内皮細胞以外の細胞の細胞膜が結合する可能性のあるドメイン領域である. SDC4 はヒトでは広範囲に発現する. ノックアウトマウスでは正常に出生するものの, 接着斑形成不全, 閉塞性腎症の増悪, 皮膚の創傷治癒の遅延が認められる. ⁶⁵⁾

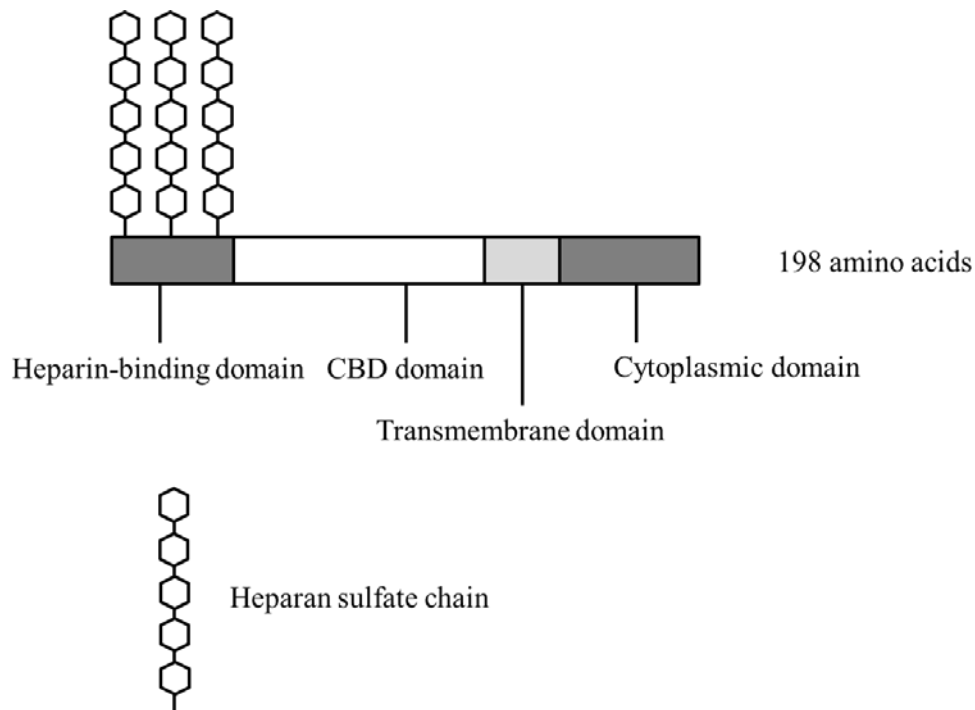


Figure 24. The domain structure of SDC4

SDC4 is the membrane protein which has heparin-binding, CBD, transmembrane, and cytoplasmic domain. Heparin sulfate chains are also indicated.

SDC4 が APS の血栓形成に与える影響については、タンパク質レベルでの報告がある。SDC4 のヘパラン硫酸の糖鎖構造を有して強い陰性荷電があり、血中の陽性荷電を有する β 2-glycoprotein I と電氣的に結合する。ここに β 2-glycoprotein I 依存性の aPL で aPL の中でも主要な抗体と考えられている Anti β 2-glycoprotein I が SDC4 と β 2-glycoprotein I の複合体に結合すると、SDC4 の抗凝固作用が複合体形成により阻害されることが報告されている (Figure 25).⁵⁷⁾

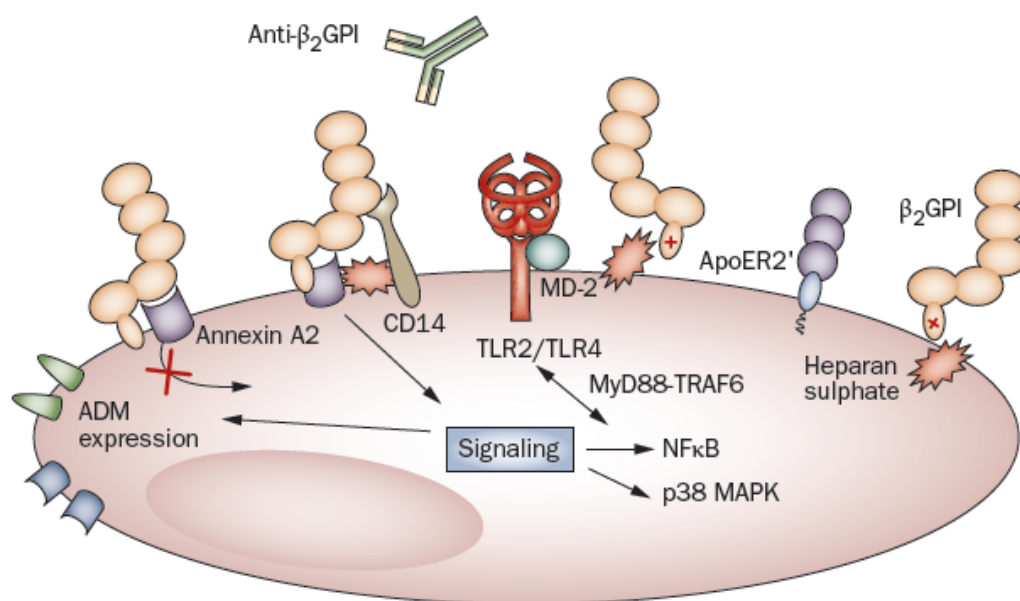


Figure. 25 Endothelial cell activation by anti β 2-glycoprotein I autoantibodies

(文献 57 より引用)

aPL react with β 2-glycoprotein I expressed on the endothelial cell membrane and induce cell signaling. β 2-glycoprotein I adheres to endothelial cell membranes through the electrostatic interaction between the cationic phospholipid-binding site in and anionic structures in heparan sulfate.

しかしながら、aPL が SDC4 の mRNA 発現レベルに与える影響は検討されていない。本章では、aPL が存在することで SDC4 の mRNA 発現量が低下して血栓傾向になる可能性について HUVEC を用いた実験により検討した。

TF, TM, SDC4 を発現する血管内皮細胞は凝固反応に加え，血圧調節，血栓制御，炎症免疫調節，創傷治癒など様々な役割を担っており，その状況に応じて分泌タンパク質や膜タンパク質を遺伝子レベルで制御しながら発現している．^{66, 67)} 生体の血管は大動脈から毛細血管まで内径は様々で末梢に行くに従って血管内圧は低下する傾向にあるが，血管内皮細胞は絶えず血液に接触しており，血流の影響を強く受けている．また，血管内皮細胞には血流による物理的力であるずり応力が加わる．ずり応力は直接血流に接する血管内皮細胞の表面に加わる力で，血管の中心を最大として血管壁で最小となる流速勾配で規定される速度勾配と血液の粘性 (μ) によって生ずる血行力学因子である (Figure 26)．通常，大動脈では $10 \sim 20 \text{ dynes/cm}^2$ ，細小動脈では 20 dynes/cm^2 ，静脈では $1.5 \sim 6 \text{ dynes/cm}^2$ のずり応力が血管内皮細胞に負荷され，血管内皮細胞の形態を始め遺伝子発現，機能にも影響を与えると考えられている．⁶⁶⁾

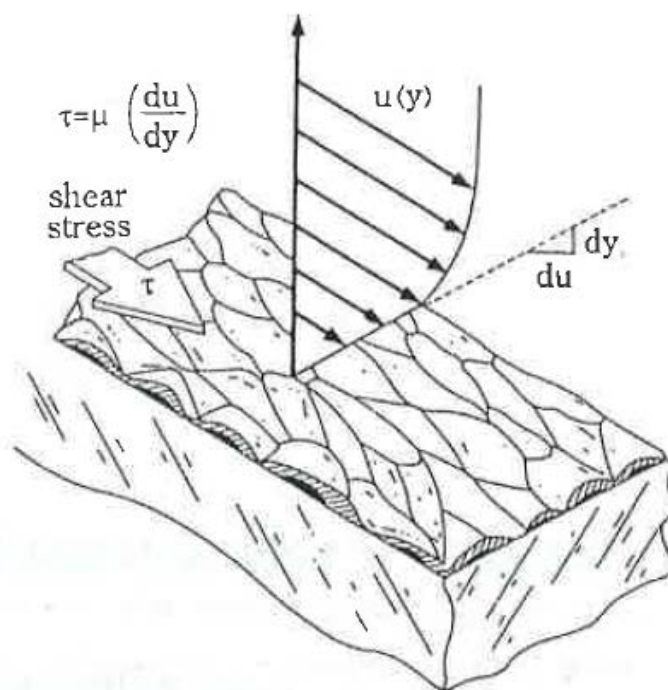


Figure 26. Definition of shear stress on vessel walls (文献 66 より引用)

Shear stress appears to be a particularly important hemodynamic force because it stimulates the release of vasoactive substances and changes gene expression, cell metabolism, and cell morphology.

ずり応力が加わることで、血管内皮細胞は平滑筋を弛緩させて血管を拡張する血管内皮由来血管拡張物質(NO), プロスタサイクリン(PGI₂), 血管収縮を起こすエンドセリン(ET-1)などを産生, 放出する. 白血球の接着に必要な因子である intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) の発現も血流により制御されており, 炎症や動脈硬化への関連も指摘されている.^{66, 68 - 70)} ずり応力が凝固・抗凝固因子に与える影響として, HUVEC にずり応力を負荷した細胞中の TM の mRNA 量がずり応力に依存して上昇し, 18 dynes/cm² の負荷では約 3 倍になることが報告されている. さらに, TNF- α などのサイトカインで TF の mRNA 発現量が上昇した HUVEC にずり応力を負荷すると TF の mRNA 発現が抑制されることが報告されており, ずり応力は mRNA レベルで, TM の発現を上昇させ, サイトカイン惹起性 TF の発現量を低下させることにより, 凝固・抗凝固因子を制御することが示唆されている.⁶⁶⁾ 特に, ずり応力による TM の発現上昇については複数の報告がある (Figure 27).⁷¹⁾

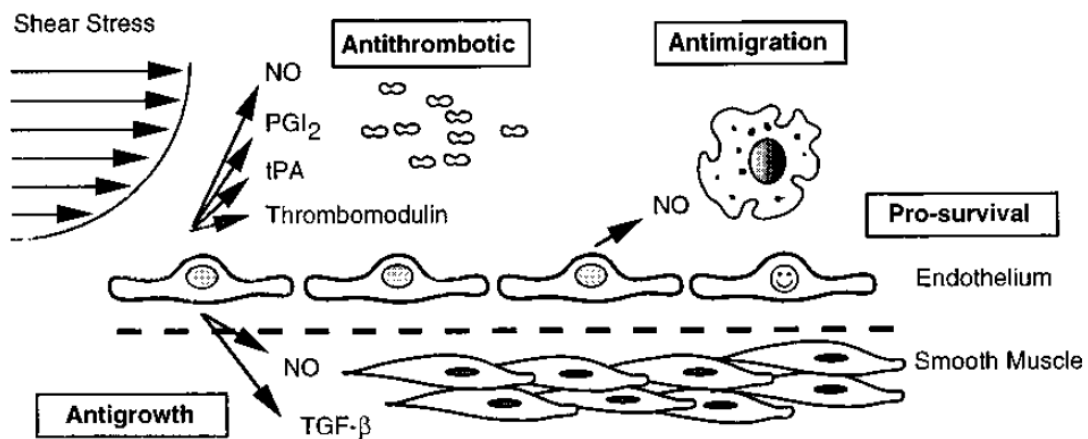


Figure 27. Endothelial cell biology and shear stress (文献 71 より引用)

Shear stress promotes release of factors from endothelial cells that inhibit coagulation, migration of leukocytes, and smooth muscle proliferation, while simultaneously promoting endothelial cell survival.

血管内皮細胞が物理的刺激であるずり応力をどのように化学的刺激に変換しているかは十分には明確になっていないが、ずり応力の受容体としてはインテグリン、カベオラ、G タンパク質共役型受容体、イオンチャンネルが考えられている。これらの受容体がずり応力の物理的刺激を受けることで下流に位置する Raf, MAP kinase kinase (MEK), ERK1/2 などが活性化され、mRNA の転写、タンパク質合成に繋がると考えられている (Figure 28).
⁷¹⁾ TF, TM はずり応力に依存して mRNA 発現量が変化するため、これらのシグナル伝達系により発現が制御されることが考えられる。

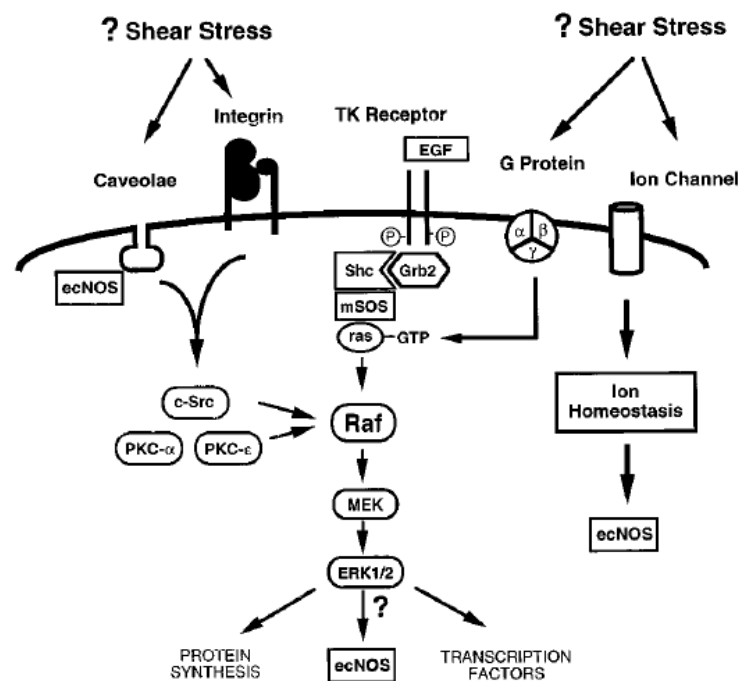


Figure 28. Proposed model of shear stress-mediated mechanotransduction in endothelial cells

(文献 71 より引用)

Primary mechanosensors (eg, integrins, caveolae, G proteins, ion channels) transduce physical stimuli into biochemical signals. Several stimuli serve to activate Raf-1, including tyrosine phosphorylation by c-Src or c-Src like kinases, serine and threonine phosphorylation by PKC, and GTP-bound ras. Raf-1 activates MEK, which in turn activates ERK1/2. Sustained generation of NO may result from the effects of ERK1/2 or through direct effects of mechanosensors themselves.

さらに、HUVEC 上での TM の発現は細胞内の cAMP を介した経路により制御されることが報告されている。^{72,73)} Maruyama ら⁷²⁾ は単相培養した HUVEC に 2 mM dibutyl cAMP を添加することで細胞表面の TM が 2 ~ 3 倍に発現上昇することを報告しており、これは川合らが報告した HUVEC に 18 dynes/cm² の負荷をかけた際の TM の発現上昇量とほぼ一致している。⁶⁶⁾ ずり応力が細胞内の cAMP を上昇させる経路としては、ずり応力により活性化された G タンパク質がアデニル酸シクラーゼを活性化して、ATP を cAMP に変換することが想定される (Figure 29). cAMP は protein kinase A (PKA) を活性化し、PKA は cAMP 応答配列結合タンパク質である cAMP response element-binding protein (CREB) をリン酸化して、CREB は二量体を形成することで DNA 上の cAMP 応答配列に結合して遺伝子の転写を引き起こす。⁷⁴⁾

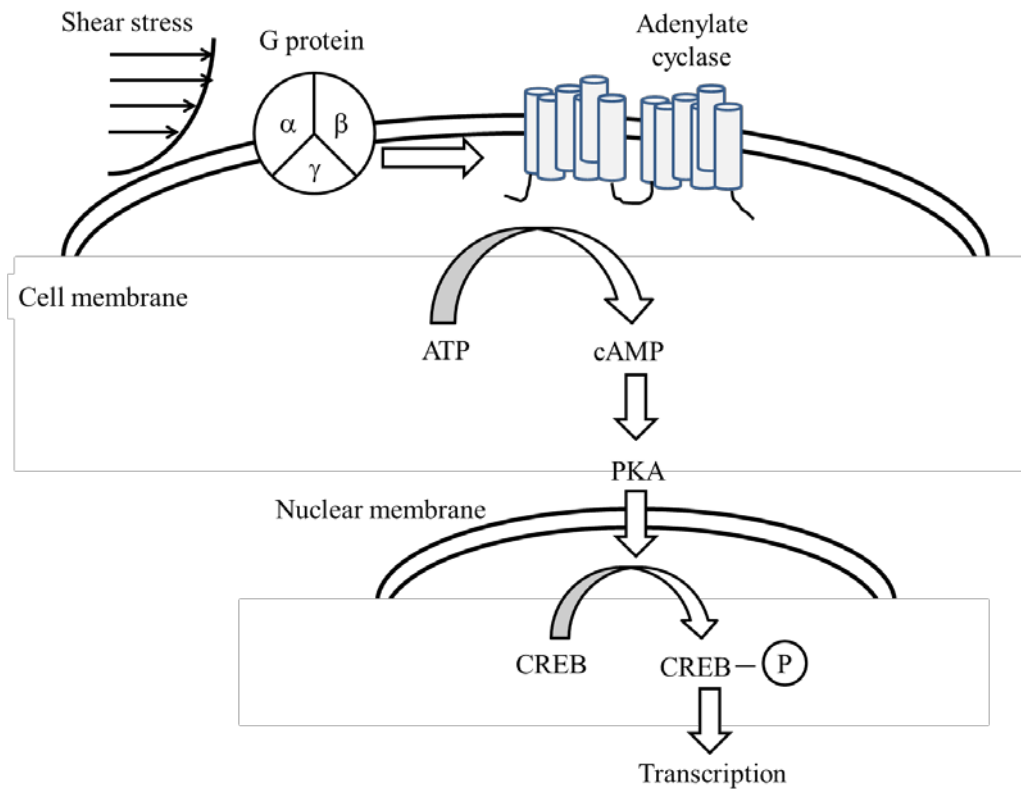


Figure 29. Shear stress-mediated transcription pathway

G protein activates adenylate chclase, and cAMP is synthesized. PKA binding cAMP activates CREB through phosphorylation.

APS の血栓形成機序として TF 発現上昇が考えられているが、aPL は多様に富むポリクローナル抗体で各 APS 患者で挙動が異なり、血栓形成は単一機序によるものではないと想定される。また、APS は全身で動静脈血栓症を発症するため、TF の発現上昇のみで臨床病態すべてを説明することはできず、他の様々な要因も考えられている。⁷⁵⁻⁸⁵⁾ 近年では、aPL が血管内皮細胞のリン脂質膜上に β 2-glycoprotein I を介して結合することで、細胞内の second messenger system が応答して p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) を活性化し、さらに p38 MAPK が転写因子に作用することで、TF, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) などの mRNA の発現量が増加することが知られている。¹²⁾ また、mRNA 発現量変化を通してタンパク質レベルでの発現量も変化し、血管内の凝固系の制御が崩れ、血栓傾向に向かうと考えられている。^{12, 57)} さらに、上述したセカンドヒット理論に関与するタンパク質として、p38 MAPK, ICAM-1, VCAM-1 に加え、toll like receptor 2, toll like receptor 4 などが示唆されている。⁸⁶⁾ これらの凝固反応に関与しないタンパク質に加え、aPL 存在下でのセカンドヒットにより凝固反応に直接関与するタンパク質の発現量が増加して、生体内が血栓傾向になると想定される。本章では、aPL が血管内皮細胞に与える刺激について注目し、血管内皮細胞に発現する凝固関連タンパク質である TF, TM, SDC4 の mRNA 発現量を測定し、aPL 存在下で血栓傾向を示すかを検討した。まず Ostertag らの実験を参考として血管内皮細胞のモデルである HUVEC に aPL を添加して TF の発現が増加することを確認し、Ostertag ら¹²⁾ と同一の挙動を示す実験系を確立した。TF が発現上昇する条件下で、凝固抑制因子である TM と SDC4 の mRNA 発現量の変化から血栓傾向となる可能性を検討した。

2) 材料および方法

(1) 使用化学物質

塩化ナトリウム (関東化学株式会社), トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris ; ナカライテスク株式会社), グリシン (キシダ化学株式会社), 塩化カリウム (関東化学株式会社), HEPES (株式会社 同仁化学研究所), リン酸水素二ナトリウム・十二水和物 (和光純薬工業株式会社), リン酸二水素カリウム (和光純薬工業株式会社), bovine serum albumin (BSA ; シグマアルドリッチジャパン合同会社) を緩衝液成分として用いた。pH 調製のために塩酸 (キシダ化学株式会社) を用いた。タンパク質を変性させるためにドデシル硫酸ナトリウム (SDS ; キシダ化学株式会社) を用い、抗原抗体反応の緩衝液中の界面活性剤として Tween 20 (シグマアルドリッチジャパン合同会社) を用いた。

(2) IgG 精製方法

血漿から aPL を含むポリクローナル IgG を精製した。IgG 精製用のサンプルとしてインフォームドコンセントの得られた健常人の血漿，市販の LA 陽性血漿（株式会社サンフコ）を用いた。血漿 1 ml に 20 mM Tris-HCl pH 7.4 を 4.5 ml 加えて希釈した。希釈した血漿を セルロースアセテイトタイプ 0.45 μm フィルターの DISMIC-25cs（アドバンテック東洋株式会社）で濾過した。抗体精製用カラムである HiTrap Protein G HP Column（GE ヘルスケアジャパン株式会社）を低圧クロマトグラフィーシステムである BioLogic LP システム（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）に連結し，washing buffer として 20 mM Tris-HCl pH 7.4，elution buffer として 100 mM Gly-HCl pH 2.7 を用いて抗体精製システムとした。washing buffer を流速 2.00 ml/min で 10 ml 流して流路に buffer を満たした。その後，希釈した血漿をアプライして washing buffer と共に流速 1.00 ml/min で 15 ml 流し，Protein G HP Column に血漿中の IgG を吸着させた。吸着後に elution buffer を流速 1.00 ml/min で 20 ml 流して IgG を Protein G HP Column から溶出した。溶出された IgG 溶液 1ml に対して 500 mM Tris-HCl pH 9.0 を氷上で 70 μl すぐに添加し，pH 7.4 に中和した。溶出された IgG 溶液を合計 10 ml 回収した。溶出後，抗体精製システムに washing buffer を流速 1.0 ml/min で 20 ml，その後，流速 2.0 ml/min で 10 ml 流して流路を洗浄した。タンパク質は O.D.280 により検出した。

溶出された IgG 溶液 10 ml を透析膜である透析用セルロースチューブ（三光純薬株式会社）に入れ，外液として 20 mM HEPES, 130 mM NaCl, 2.5 mM KCl 溶液を 1L 用いて透析を 4°C で行った。透析開始の 1 時間後と 2 時間後に外液を交換し，その後は外液交換を行わずに 12 時間透析した。透析後に IgG 溶液を回収してセルロースアセテイトタイプ 0.20 μm フィルターの DISMIC-25cs（アドバンテック東洋株式会社）で濾過した。

濾過後，IgG 溶液を Amicon Ultra Centrifugal Filter 4 ml 50K（Merck Millipore）に入れ，1,500 $\times g$ で 20 分間室温で遠心して 10 mg/ml に濃縮して精製 IgG とした。TP 試薬・B「コクサイ」（シスメックス株式会社）と生化学検査用装置である自動分析装置 7180（株式会社 日立ハイテクノロジーズ）を用いて総タンパク質濃度を測定することで精製 IgG 濃度を確認し，希釈して 10 mg/ml に調整した。

(3) 精製 IgG の SDS-PAGE

精製 IgG を 20 mM HEPES, 130 mM NaCl, 2.5 mM KCl 溶液で 200 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した。また，HiTrap Protein G HP Column に吸着されなかった素通り分画の回収液も 20 mM HEPES,

130 mM NaCl, 2.5 mM KCl 溶液で 10 倍に希釈した. 3 × SDS Sample Buffer Blue (Cell Signaling) 7 µl と各サンプル 14 µl を混合した. また, 精製 IgG のサンプルは 10% の 2-メルカプトエタノール (関東化学株式会社) を含んだ 3 × SDS Sample Buffer Blue を使用したサンプルも合わせて調製し, 還元と非還元の 2 種類のサンプルを準備した. 調製したサンプルを 95°C で 2 分間加温し, タンパク質を変性させて SDS-PAGE サンプルとした.

SDS-PAGE のゲルにはミニプロティアン TGX ゲル 4-20% gradient gel 15 wells (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社) を用いた. ゲルを縦型電気泳動装置 (GE ヘルスケアジャパン株式会社) に設置して装置を SDS-PAGE running buffer (25 mM Tris, 191 mM グリシン, 0.1% SDS) で満たし, 各サンプルを 12 µl アプライした. サイズマーカールにはプレシジョン Plus プロテイン 2 色スタンダード (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社) を 5 µl アプライした. アプライ後, 20 mA で 1 時間の泳動を行った.

泳動後にゲルを回収し, 滅菌精製水を満たして 5 分間振盪させる作業を 3 回繰り返した. 染色液として Rapid CBB KANTO 3S (関東化学株式会社) を用いて 30 分間振盪させた. 染色後に滅菌精製水で脱色した.

(4) 精製 IgG の ELISA による反応性の確認

精製 IgG が精製過程で失活していないか確認するために β2-glycoprotein I による ELISA を行い, 反応性を確認した. まず, β2-glycoprotein I 溶液 4 mg/ml (ヤマサ醤油株式会社) を phosphate buffered saline (PBS ; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄) で 1000 倍に希釈して 4 µg/ml とした. 希釈した β2-glycoprotein I 溶液を, プレート表面を radiation してマイナスチャージを有する ELISA 用プレートカルボ (住友ベークライト株式会社) に 50 µl ずつ添加し, well の底に行き渡るように攪拌後, フィルムカバーをして 4°C, over night で固相化した. 4°C で固相化後にプレートを室温に戻し, 各 well に PBS を 200 µl ずつ添加して wash した. wash 後, PBS - 1% BSA を 125 µl 添加し, 37°C で 1 時間インキュベーションしてブロッキングを行った. 精製 IgG と対照として精製前の血漿を PBS - 1% BSA で 50 倍希釈し, ブロッキングした well に 50 µl ずつ添加して 1 時間室温で静置し, 固相化した β2-glycoprotein I とサンプル中の抗体で抗原抗体反応をさせた. 反応後, 非特異的な反応成分を除去するために, PBS - 0.05% Tween 20 を 200 µl 添加し, 3 回 wash した. Anti-Human IgG - Alkaline Phosphate antibody produced in goat (シグマアルドリッチジャパン合同会社) を PBS で 4000 倍希釈して 50 µl ずつ well に添加し, 1 時間室温で静置した. 再度, PBS - 0.05% Tween 20 を 200 µl 添加して 3 回 wash

した。基質として、p-Nitrophenyl Phosphate Substrate を用いた ELISA 用アルカリホスファターゼイエロー (pNPP) 液体基質システム (シグマアルドリッチジャパン合同会社) により、p-Nitrophenyl Phosphate Substrate 溶液 90 μ l を well に添加した。静置後、反応を停止させずに状況を見ながら 30 ~ 60 分でコロナマイクロプレートリーダー MTP-120 (コロナ電気株式会社) で 415 nm の吸光度を発色法により検出した。既に unit が値付けされている血漿をキャリブレーターとして用い、検量線を作成することでサンプルの unit を算出した。

(5) 使用細胞

血管内皮細胞として、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Pooled Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVEC) (ロンザジャパン株式会社) を用いた。実験には、主に継代 3 ~ 4 代目の培養細胞を用いた。

(6) 細胞培養方法

HUVEC の培養容器にはベントキャップタイプ 25 cm^2 細胞培養用フラスコ (FALCON) を用いた。gelatin (関東化学株式会社) を水に溶解して 2% gelatin 溶液を調製し、Hanks' Balanced Salt Solution (GIBCO) で 4 倍希釈した 0.5% gelatin 溶液を、細胞培養用フラスコに 5 ml 加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間静置し、gelatin coating を行った。培養液として、EGM-2 (ロンザジャパン株式会社) を用いた。EGM-2 は基本培地に fetal bovine serum (FBS), rhFGF-B, GA-1000, rhEGF, VEGF, hydrocortisone, heparin, ascorbic acid, R³-IGF-1 を添加するキットである。なお、FBS の終濃度は 2% とした。調製した EGM-2 で HUVEC を懸濁し、25 cm^2 細胞培養用フラスコに 5 ml 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 インキュベーター (パナソニックヘルスケア株式会社) 内で静置した。培地交換は 2 日に 1 回実施した。

(7) 培養細胞の回収方法

25 cm^2 細胞培養用フラスコで培養した HUVEC から EGM-2 をアスピレーターで吸引して滅菌 PBS を 5 ml 加え、HUVEC を wash した。wash 後に滅菌 PBS をアスピレーターで吸引し、トリプシン/EDTA を 500 μ l 加え、フラスコ全体に行き渡らせた。HUVEC のフラスコ底の接着が弱まっていることを確認し、タップして HUVEC を完全にフラスコ底から遊離させた。トリプシンを中和するために、EGM-2 を加え、HUVEC を懸濁した上で回収した。回収後、トリプシンを除去するために、100 \times g で 5 分間室温で遠心して上清を取り除き、新たに EGM-2 を加えて HUVEC を懸濁した。

(8) HUVEC への aPL と LPS 添加によるセカンドヒット理論の検証

APS 患者ではセカンドヒット理論として aPL 存在下で感染症をトリガーとして血栓症を発症することが報告されている。^{57, 87)} 本章では, aPL を含むポリクローナル精製 IgG に加えて LPS を添加し, 感染症を再現してセカンドヒット理論の検証を行った. 具体的には, 細胞培養用フラスコから回収した HUVEC を 1.5×10^4 cells/well になるように 0.5% gelatin 溶液で gelatin coating した 96 wells 細部培養プレート (FALCON) に添加した. また, 合計の培地量が 300 μ l になるように EGM-2 を加えて 37°C 5% CO₂ インキュベーターで over night で培養した. HUVEC を 100% confluent として well に十分に接着したことを確認の上, EGM-2 に 0.2 mg/ml 精製 IgG, 10 ng/ml LPS (シグマアルドリッチジャパン合同会社), 5 μ g/ml β 2-glycoprotein I を含有させた培地と交換して 37°C 5% CO₂ インキュベーターで既報に従い 4 時間培養した.^{11, 12, 75, 81)} Ostertag らの TF の発現上昇の実験を始め, aPL を添加して mRNA の変化を検出する実験では培養時間を 4 時間とする報告が複数あるため, 本研究でも 4 時間とした.¹²⁾ β 2-glycoprotein I とリン脂質の複合体は aPL の抗原の一つと考えられているため, aPL の細胞への結合を促進させるために β 2-glycoprotein I を培地に添加した. なお, 精製 IgG 添加の対照として精製 IgG 未添加の培地を調製して同様に実験に用いた. 各実験条件を n=3 で実施し, 平均値と SD を算出した.

(9) HUVEC への精製 IgG 添加の培養時間検討

96 wells 細部培養プレートで 100% confluent とした HUVEC に, EGM-2 に 0.2 mg/ml 精製 IgG, 10 ng/ml LPS, 5 μ g/ml β 2-glycoprotein I を含有させた培地を添加して 37°C 5% CO₂ インキュベーターで 4 時間と 24 時間培養した. HUVEC の TM の mRNA 発現量は刺激する物質に応じて, 刺激から 24 時間継続的に発現変化を認める場合と 刺激が一過性で 24 時間後に添加前の発現量となる場合がある.^{88, 89)} aPL は継続的と一過性のどちらの刺激かを解明するために, 24 時間培養後に mRNA 発現量を測定し, 4 時間での発現量と比較を行った.

(10) HUVEC への cAMP 添加の検討

緒言で示したように生体内では血管内皮細胞にはずり応力の負荷がかかり, HUVEC はずり応力の負荷環境下では TM の mRNA 量が約 3 倍に発現上昇する. よって, TM の生体内の発現量は静置培養状態の約 3 倍程度高いことが想定される. Maruyama ら⁷²⁾ は 3

mM dibutyryl cAMP を HUVEC に添加することで、ずり応力存在下での発現上昇量とほぼ同じ約 2 ～ 3 倍に TM を上昇させているため、本実験では、ずり応力により細胞内の濃度が上昇すると考えられる cAMP のアナログである dibutyryl cAMP を用いて TM の発現を上昇させて生体内の発現量に近づけることを考えた。方法は 96 wells 細部培養プレートで 100% confluent とした HUVEC へ EGM-2 に 0.2 mg/ml 精製 IgG, 10 ng/ml LPS, 5 µg/ml β2-glycoprotein I に加え N⁶,2'-O-Dibutyrylated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (cAMP; シグマアルドリッチ合同会社) を含有させた培地を添加し, 37°C 5% CO₂ インキュベーターで 4 時間と 24 時間培養した。cAMP の濃度は Maruyama ら⁷²⁾ の 3 mM cAMP のデータを参考として 0, 0.1, 1, 5 mM とした。

(11) RNA 抽出方法

HUVEC の培養後に細胞数が十分あることを確認して RNA 抽出を Taqman Fast Cells to Ct Kit (Applied Biosystems) を用いて実施した。まず、培地をすべて取り除き, 4°C で冷却した PBS を添加して wash した。キットの DNase I と lysis solution を 1 : 100 の比率で混合の上, 各 well に 50 µl ずつ添加した。添加後, 泡が生じないようにゆっくりと 5 回ピペッティングを行って HUVEC を lysis し, 室温で 5 分間静置した。静置後にキットの stop solution を 5 µl 添加して泡が生じないようにゆっくりと 5 回ピペッティングを行い, lysis 反応を停止させて 2 分間静置した。静置後, cell lysate として 1.5 ml チューブに移し, -80°C で保存した。

(12) reverse transcription 反応

cell lysate を -80°C から取り出して氷上で融解した。nuclease free water (GIBCO) を 12.5 µl, Taqman Fast Cells to Ct Kit の 2×RT Buffer を 25 µl, キットの 20×RT Enzyme Mix を 2.5 µl を混合し, そこに cell lysate を 10 µl 添加して reverse transcription サンプルとした。reverse transcription サンプルを PCR 装置である GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) にセットして 37°C 60 分間で reverse transcription を行い, 95°C 5 分間で酵素を失活させて以降は 4°C 保存となるプログラムで反応させた。PCR 装置で反応後の溶液を reverse transcription 反応液とし, -80°C で保存した。

(13) Real Time PCR 反応方法と解析方法

Real Time PCR 反応にはプローブには Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

を用いた。TF, TM, SDC4 のプローブとしてそれぞれ Hs01076029-m1, Hs00264920-s1, Hs00161617-m1 を用いた。内在性コントロールは 18s rRNA のプローブ Hs99999901-s と GAPDH のプローブ Hs02758991_g1 を用いて n=3 でデータを取得し, SD の低い 18s rRNA を採用した。nuclease free water を 5 μ l, Kit 中の Taqman Fast Universal PCR Master Mix を 10 μ l, 各 Taqman Gene Expression Assay を 1 μ l ずつ混合し, そこに Reverse Transcription 反応液を 4 μ l 添加, 混合して Real Time PCR サンプルとした。なお, 18s rRNA のサンプルでは RNA 濃度が高いことを考慮し, nuclease free water で reverse transcription 反応液を 100 倍希釈して Real Time PCR サンプルを調製した。調製後, Real Time PCR サンプルを Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems) にセットして 95°C で 20 秒間加温後, 95°C 1 秒間と 60°C 20 秒間を 40 サイクル繰り返して Real Time PCR を行い, PCR による DNA の合成反応から生じるプローブのレポーターの蛍光を検出した。検出された蛍光量とサイクル数の関係から Ct 値を算出して内在性コントロールを対照とした Δ Δ Ct 法により, mRNA 発現量を比較した。 Δ Δ Ct 法は, ターゲット遺伝子の Ct 値と内在性コントロールの Ct 値の差を算出して Δ Ct を求め, 各実験条件の Δ Ct 値と基準となる実験条件の Δ Ct 値の差を算出して Δ Δ Ct 値を求めて $2^{-\Delta\Delta Ct}$ を算出して基準となる実験条件の mRNA 発現量を 1 とした場合の各実験条件の mRNA 発現量を相対値で比較する方法である。 Δ Δ Ct 法は検量線を作成せずに mRNA 発現量を比較定量する方法であり, Real Time PCR の 1 サイクルの違いで発現量が 2 倍量の差があるという理論を活用したメーカー推奨の解析方法である。⁹⁰⁾

(14) 統計解析方法

統計検定は Microsoft Excel エクセル統計 2012 により行った。Medium IgG (-), Normal IgG, LA IgG の比較は多重比較である Dunnett 検定を用い, 各群の中での 4 時間と 24 時間の培養時間の比較には Student's t-test を用いた。また, 危険率は 0.05 とし, $p < 0.05$ を統計的に有意差があると判断した。

3) 結果

(1) IgG 精製の溶出パターン

IgG を Protein G により精製した (Figure 30). サンプルをアプライして IgG をカラム中の Protein G に吸着させた. 8 ~ 17 分間に O.D.280 が大きく上昇し, IgG 以外の成分がカラムを素通りしたと考えられた. さらに, elution buffer に置換してから 3 ~ 4 分後に O.D.280 が上昇したため, IgG の溶出分画と考えて 10 ml 回収して IgG 溶液とした. APS 患者の IgG 分画には aPL が含まれていると考えて以降の実験を行った.

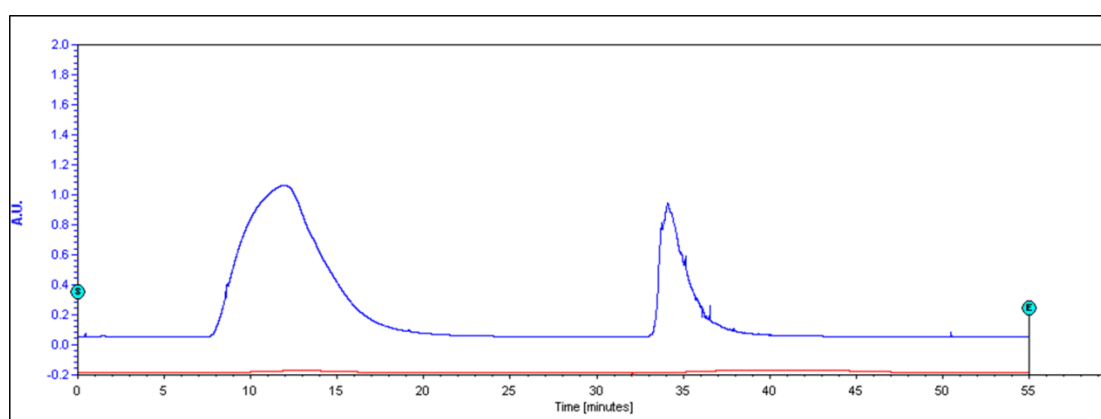


Figure 30. O.D.280 value in IgG purification

Sample was applied to HiTrap Protein G HP Column, and IgG was trapped to Protein G. After wash, IgG was eluted by elution buffer. The protein concentration was investigated by O.D.280. S and E letters indicate start point and end point, respectively.

(2) 精製 IgG の SDS-PAGE

精製 IgG の SDS-PAGE を行い、各サンプルの純度を確認した (Figure 31)。健常人血漿と LA 陽性血漿ともに非還元状態では、100 kDa 以上の分子量で複数のバンドが認められた。なお、非還元状態ではあるが buffer 中の SDS により IgG のジスルフィド結合が一部切断されて 100 kDa 以上の分子量で複数のバンドを示したと考えられる。一方、還元状態では 100 kDa のバンドが消失して 25 kDa と 50 kDa の 2 本のバンドが認められたことから、IgG のジスルフィド結合が切断されて light chain と heavy chain に分かれたと考えられた。非還元状態と還元状態の SDS-PAGE のバンドパターンから、ポリクローナル IgG として高純度で精製されていることを確認した。

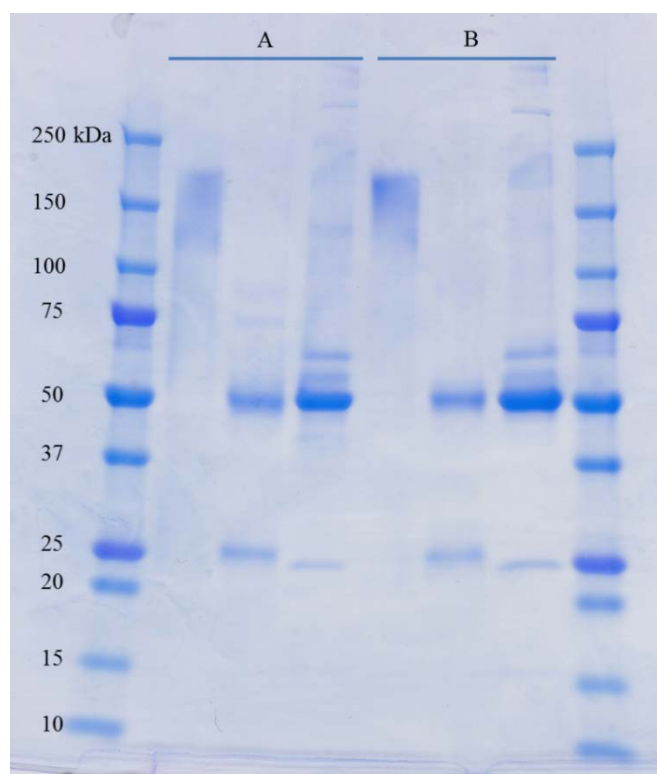


Figure 31. SDS-PAGE of purified IgG

SDS-PAGE of purified IgG from LA patient and normal plasmas was shown in Figure 18. A and B lanes indicate LA patient and normal samples lanes, respectively. The left, center, and right lanes in A and B show the non-reduced purified IgG, the reduced purified IgG (including 2-mercaptoethanol) and the non-reduced flow through fraction, respectively. The broad bands of about 150 kDa in the non-reduced lanes are purified IgG, and the 25 and 50 kDa bands in the reduced lanes indicate light and heavy chain of IgG, respectively.

(3) 精製 IgG の ELISA による反応性の確認

LA 患者血漿, および, 健常人血漿から IgG を精製し, 10 mg/ml に濃縮したサンプルを用いて, β 2-glycoprotein I と陰性荷電の複合体に対する抗体の反応性を ELISA で確認した (Figure 32). また, IgG 精製前の血漿を対照サンプルとして用いた. カットオフ値は 10.4 Unit と設定されており, LA 患者血漿では 50.8 Unit で陽性, 健常人血漿では -4.5 Unit で陰性の結果が得られた. LA 患者血漿の精製 IgG では 108.9 Unit で陽性, 健常人血漿の精製 IgG では -5.3 Unit で陰性の結果が得られた. LA サンプルでは, 血漿と比較して精製 IgG の方が高値であり, 約 2 倍の Unit 数を示し, β 2-glycoprotein I と陰性荷電の複合体に対する抗体が多く存在することを確認した. 一方, 健常人血漿では, 血漿と精製 IgG ともに反応性が無く, β 2-glycoprotein I と陰性荷電の複合体に対する抗体は存在しないことを確認した.

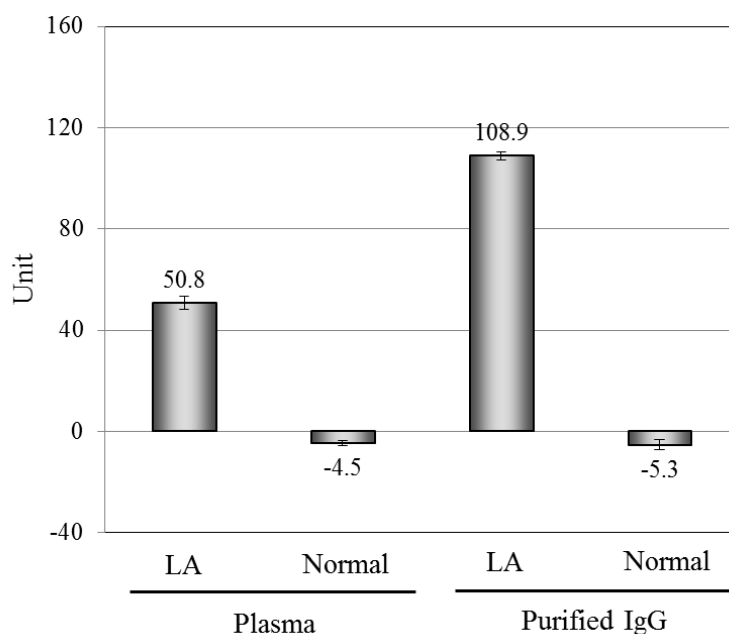


Figure 32. β 2-glycoprotein I IgG ELISA

β 2-glycoprotein I IgG ELISA was tested for the separate quantitative detection of IgG antibodies against β 2-glycoprotein I in plasma and purified IgG samples. The cut-off value was considered as 10.4 Unit in general. LA plasma and purified IgG indicate 50.8 and 108.9 Unit, respectively, and these results mean that both samples were positive. On the other hand, normal plasma and purified IgG indicate -4.5 and -5.3 Unit, respectively, and these results mean that both samples were negative. The unit was determined twice.

(4) Real Time PCR 反応

cell lysate を用いた reverse transcription 反応から HUVEC 中の mRNA に対する cDNA を合成し, cDNA を template として rRNA 18s, TF, TM, SDC4 の Real Time PCR を実施した. 本章で用いた stepone real time PCR では, 横軸を cycle 数, 縦軸を ΔRn として amplification plot が作成される (Figure 33). 作成された amplification plot から threshold line を作成し, Ct 値を算出した.

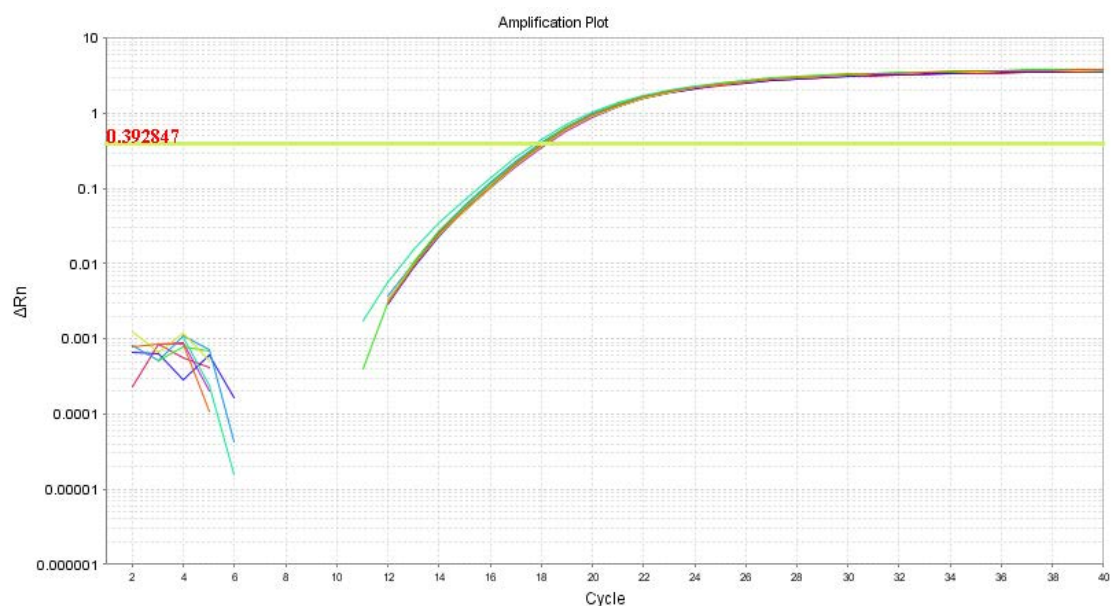


Figure 33. Amplification plot screen of 18s in StepOne Real Time PCR System

Amplification plot represents the fluorescence in each cycle, and amplification curve of 18s was graphed in each experimental condition. There was little difference of 18s amplification curve in each experimental condition, and 18s was used as the endogenous control in this study. The horizontal line in the graph indicates the threshold line.

(5) HUVEC への aPL と LPS 添加によるセカンドヒット理論の検証

APS 患者で感染症をトリガーとして血栓症を発症することを想定し, aPL 存在下で LPS を HUVEC に添加して TF の mRNA 発現量を測定した (Figure 34). 精製 IgG を添加していない Medium IgG (-) 条件下での TF の mRNA 発現量を 1.0 としたときの健常人血漿の精製 IgG, LA 患者血漿の精製 IgG 添加時の TF の mRNA 発現量はそれぞれ 1.3, 2.5 であり, LA IgG で TF mRNA は高値を示した. この結果より, セカンドヒット理論に従って aPL 存在下で LPS が TF mRNA 発現量を上昇させているため, Ostertag ら¹²⁾ と同一の挙動を示す実験系を確立したと考えた. なお, LPS を添加しない場合はそれぞれの TF 発現量に差は認められなかった.

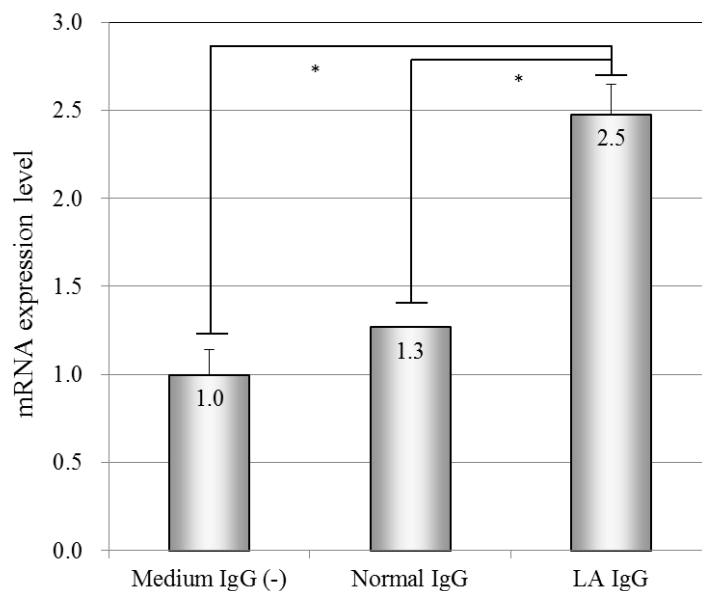


Figure 34. TF mRNA expression level in second hit condition

TF mRNA expression levels were investigated in HUVEC cultured with normal IgG or LA IgG, in addition to Medium IgG (-) as reference. The TF mRNA level of Medium IgG (-) was established as standard, and those of normal IgG and LA IgG were calculated as relative values. That of LA IgG was much higher than that of Medium IgG (-) and normal IgG, and it shows that the experiment was established according to Ostertag's method. Each sample was assayed in triplicate (n=3). The bars indicate SD. *Statistically significant ($p < 0.05$).

(6) HUVEC への aPL と LPS 添加による TM の発現量変化

LA IgG 添加で TF の mRNA 発現上昇を認める実験系で TM の mRNA 発現量を測定した (Figure 35). Medium IgG (-) の条件下での TM の mRNA 発現量を 1.0 としたときの健常人血漿の精製 IgG, LA 患者血漿の精製 IgG 添加時の TM の mRNA はそれぞれ 1.2, 0.7 であり, LA IgG で TM の mRNA は低値を示した.

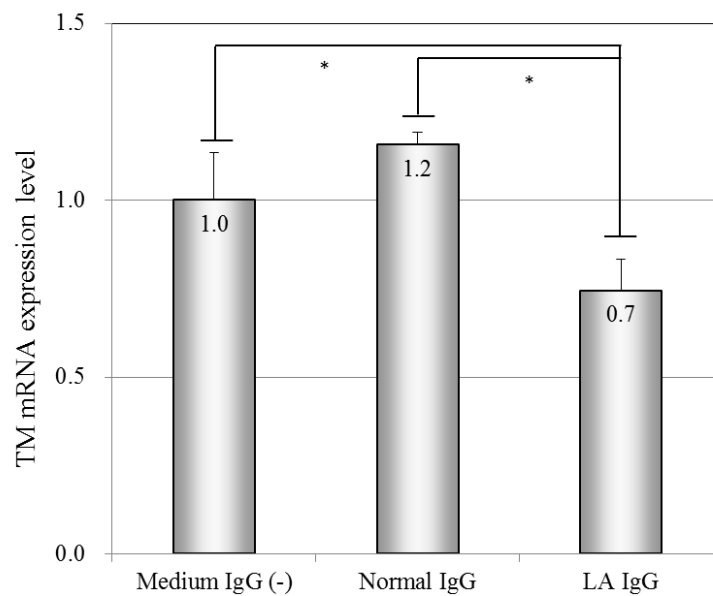


Figure 35. TM mRNA expression level in second hit condition

TM mRNA expression levels were investigated in HUVEC cultured with normal IgG or LA IgG, in addition to Medium IgG (-) as reference. The TM mRNA level of Medium IgG (-) was established as standard, and those of normal IgG and LA IgG were calculated as relative values. That of LA IgG was lower than that of Medium IgG (-) and normal IgG. Each sample was assayed in triplicate (n=3). The bars indicate SD. *Statistically significant ($p < 0.05$).

(7) HUVEC への aPL と LPS 添加による SDC4 の発現量変化

LA IgG 添加で TF の mRNA 発現上昇を認める実験系で SDC4 の mRNA 発現量を測定した (Figure 36). Medium IgG (-) の条件下での SDC4 の mRNA 発現量を 1.0 としたときの健常人血漿の精製 IgG, LA 患者血漿の精製 IgG 添加時の SDC4 の mRNA はそれぞれ 1.0, 1.1 であり, LA IgG 添加による SDC4 の mRNA 変化は認められなかった.

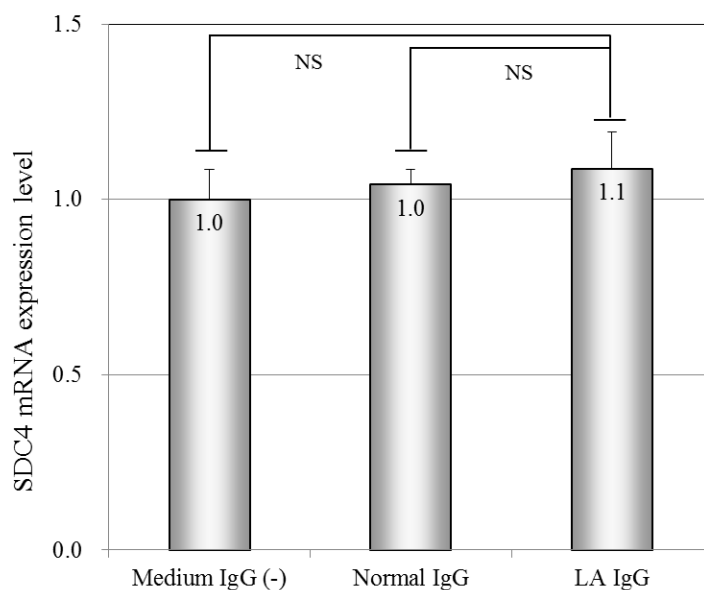


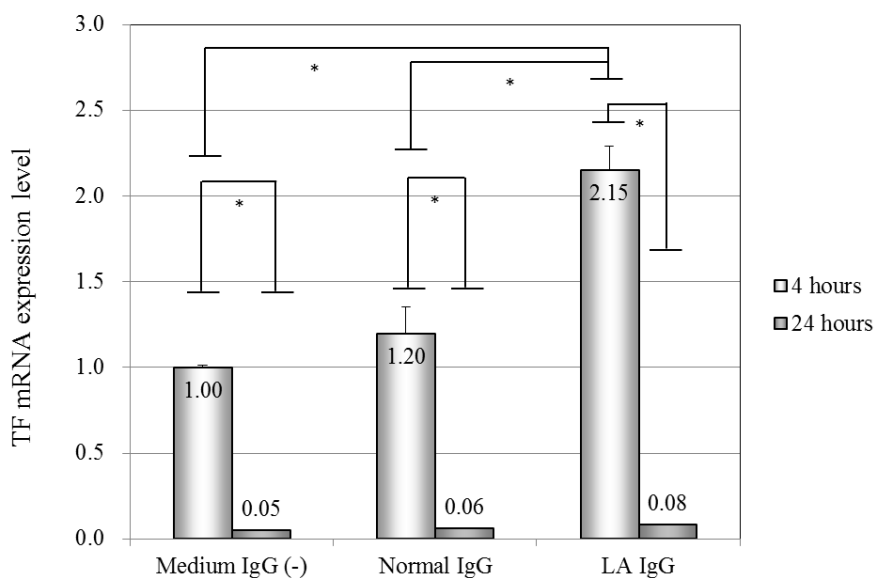
Figure 36. SDC4 mRNA expression level in second hit condition

SDC4 mRNA expression levels were investigated in HUVEC cultured with normal IgG or LA IgG, in addition to Medium (-) IgG as reference. The SDC4 mRNA level of Medium (-) IgG was established as standard, and those of normal IgG and LA IgG were calculated as relative values. That of LA IgG was the same level as that of Medium (-) IgG and normal IgG. Each sample was assayed in triplicate (n=3). The bars indicate SD. NS, not significant.

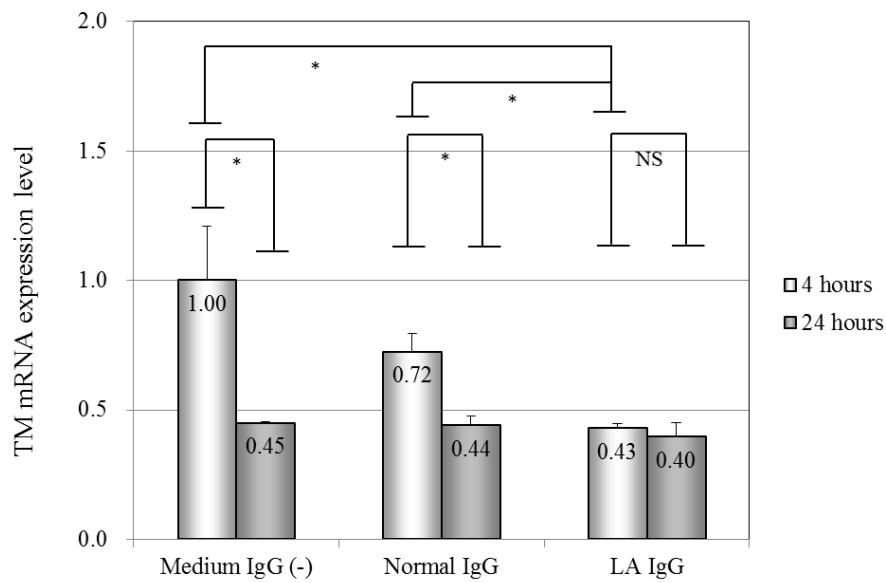
(8) HUVEC への精製 IgG 添加の培養時間検討

HUVEC に精製 IgG, LPS, β 2-glycoprotein I を添加して 37°C 5% CO₂ インキュベーターで 4 時間と 24 時間培養し, TF, TM, SDC4 の mRNA 発現量の経時変化を測定した (Figure 37). Medium IgG (-) で 4 時間培養の条件下での各 mRNA 発現量を 1.0 としたときの, 健常人血漿の精製 IgG, LA 患者血漿の精製 IgG 添加時の各 mRNA 発現量を算出した. Medium IgG (-), 健常人血漿の精製 IgG, LA 患者血漿の精製 IgG による TF の mRNA 発現量は 4 時間培養では, それぞれ 1.00, 1.20, 2.15, 24 時間培養ではそれぞれ 0.05, 0.06, 0.08 であり, 4 時間と 24 時間で有意差が認められ, 時間とともに減少する傾向が認められた. TM の mRNA 発現量は 4 時間培養では, それぞれ 1.00, 0.72, 0.43, 24 時間培養ではそれぞれ 0.45, 0.44, 0.40 であり, 4 時間と 24 時間の比較において Medium IgG (-), 健常人血漿の精製 IgG では有意に減少し, LA 患者血漿の精製 IgG では有意差は認められず, ほぼ一定値の結果が得られた. SDC4 の mRNA 発現量は 4 時間培養では, それぞれ 1.00, 0.89, 1.53, 24 時間培養ではそれぞれ 1.00, 1.15, 0.92 であり, 4 時間と 24 時間の比較では Medium IgG (-) は有意差が認められず, 健常人血漿の精製 IgG では有意に上昇し, LA 患者血漿の精製 IgG では mRNA が有意に減少する結果が得られた.

a) TF mRNA expression level



b) TM mRNA expression level



c) SDC4 mRNA expression level

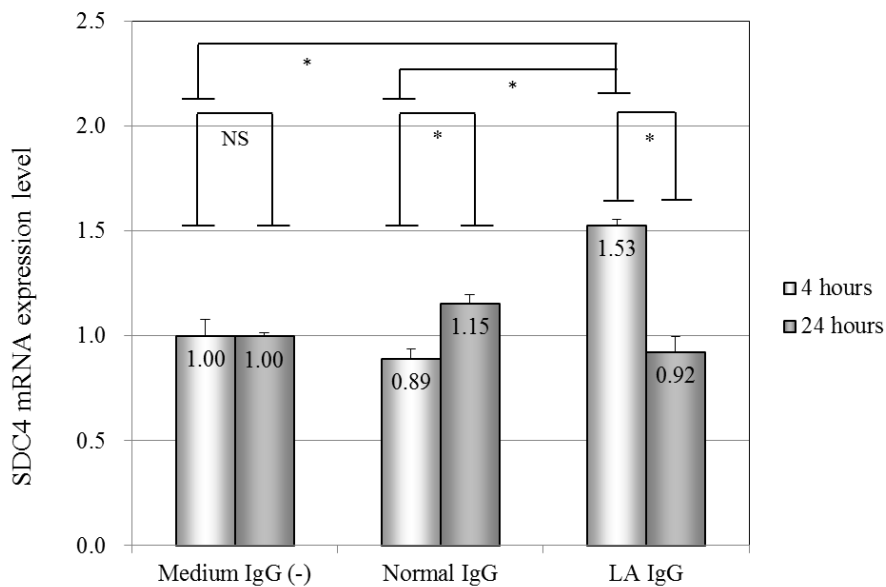
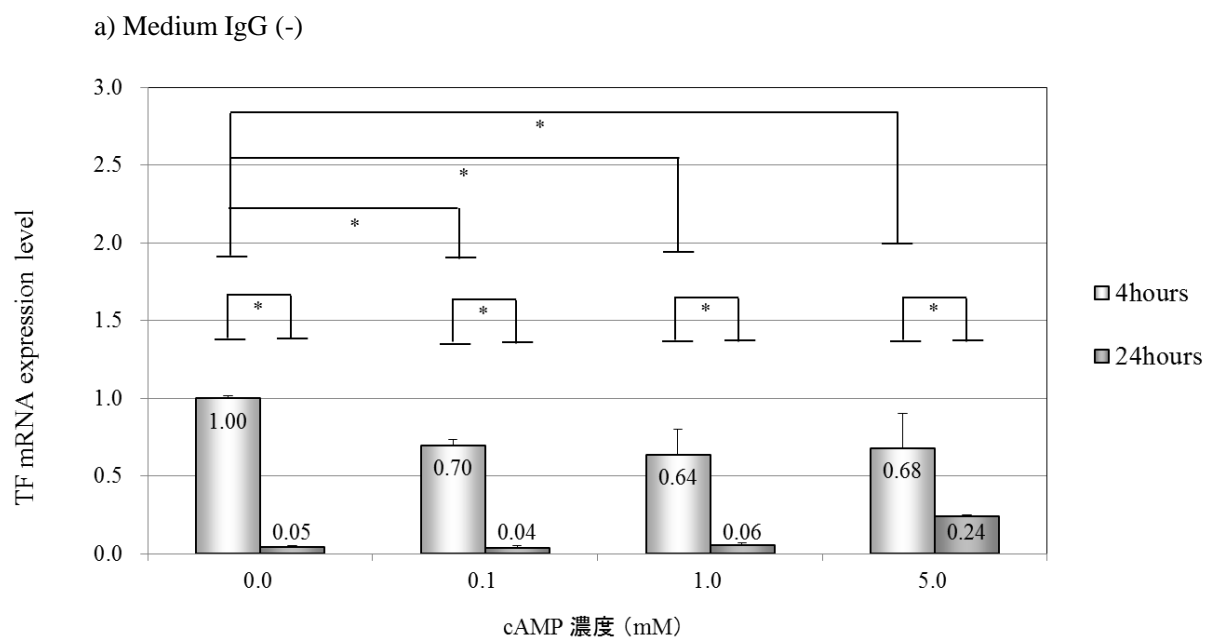


Figure 37. Time course for the mRNA expression level of TF, TM and SDC4

HUVEC were cultured with normal IgG, LA IgG, or Medium IgG (-) as reference for 4 or 24 hours. Each mRNA level of Medium IgG (-) for 4hours incubation was established as standard, and the other mRNA levels were calculated as relative values. Each sample was assayed in triplicate (n=3). The bars indicate SD. *Statistically significant ($p < 0.05$). NS, not significant.

(9) HUVEC への cAMP 添加による TF の発現量の変化

HUVEC に精製 IgG, LPS, β 2-glycoprotein I に加え, cAMP を終濃度が 0, 0.1, 1.0, 5.0 mM となるように培地に添加し, 37°C 5% CO₂ インキュベーターで 4 時間と 24 時間培養し, TF の mRNA 発現量の経時変化を比較した (Figure 38). Medium IgG (-) で 4 時間培養の条件下での TF の mRNA 発現量を 1.0 としたときの, 0, 0.1, 1.0, 5.0 mM cAMP の mRNA 発現量を算出した. Medium IgG (-) での TF の mRNA 発現量は 4 時間培養ではそれぞれ 1.00, 0.70, 0.64, 0.68, 24 時間培養ではそれぞれ 0.05, 0.04, 0.06, 0.24 であり, 4 時間培養における cAMP 0 mM と 0.1, 1.0, 5.0 mM との間に有意差が認められた. また, 4 時間と 24 時間培養の比較ではいずれの cAMP 濃度でも有意に mRNA が減少する傾向が認められた. 健常人血漿の精製 IgG での TF の mRNA 発現量は 4 時間培養ではそれぞれ 1.20, 1.03, 0.80, 0.66, 24 時間培養ではそれぞれ 0.06, 0.05, 0.07, 0.24 であり, 4 時間培養における cAMP 0 mM と 1.0, 5.0 mM に有意差が認められ, 4 時間と 24 時間培養の比較ではいずれの cAMP 濃度でも有意に mRNA が減少する傾向が認められた. LA 患者血漿の精製 IgG での TF の mRNA 発現量は 4 時間培養ではそれぞれ 2.15, 1.51, 0.81, 0.61, 24 時間培養ではそれぞれ 0.08, 0.05, 0.06, 0.26 であり, 4 時間培養における cAMP 0 mM と 0.1, 1.0, 5.0 mM に有意差が認められ, 4 時間と 24 時間培養の比較ではいずれの cAMP 濃度でも有意に mRNA が減少する傾向が認められた.



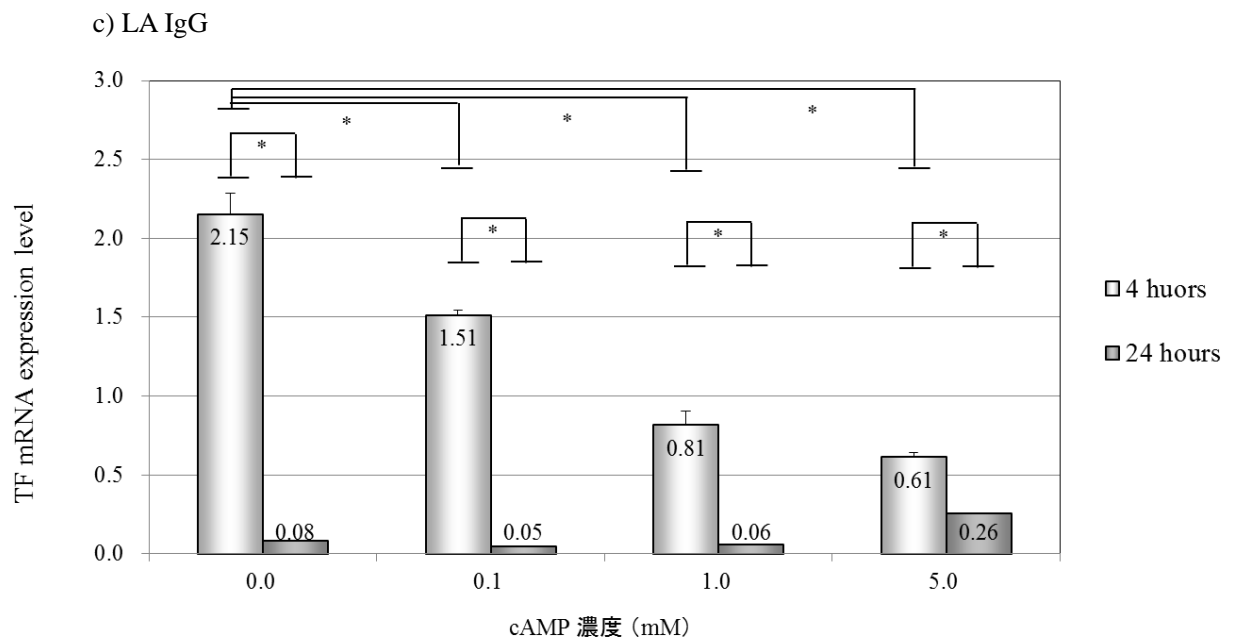
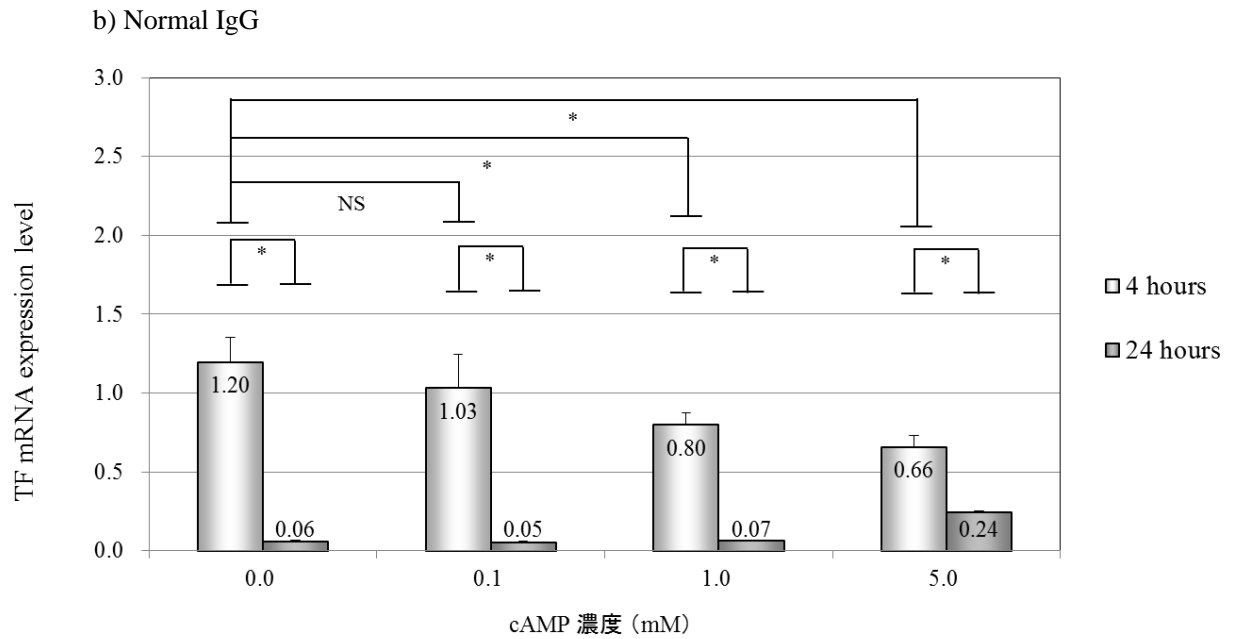
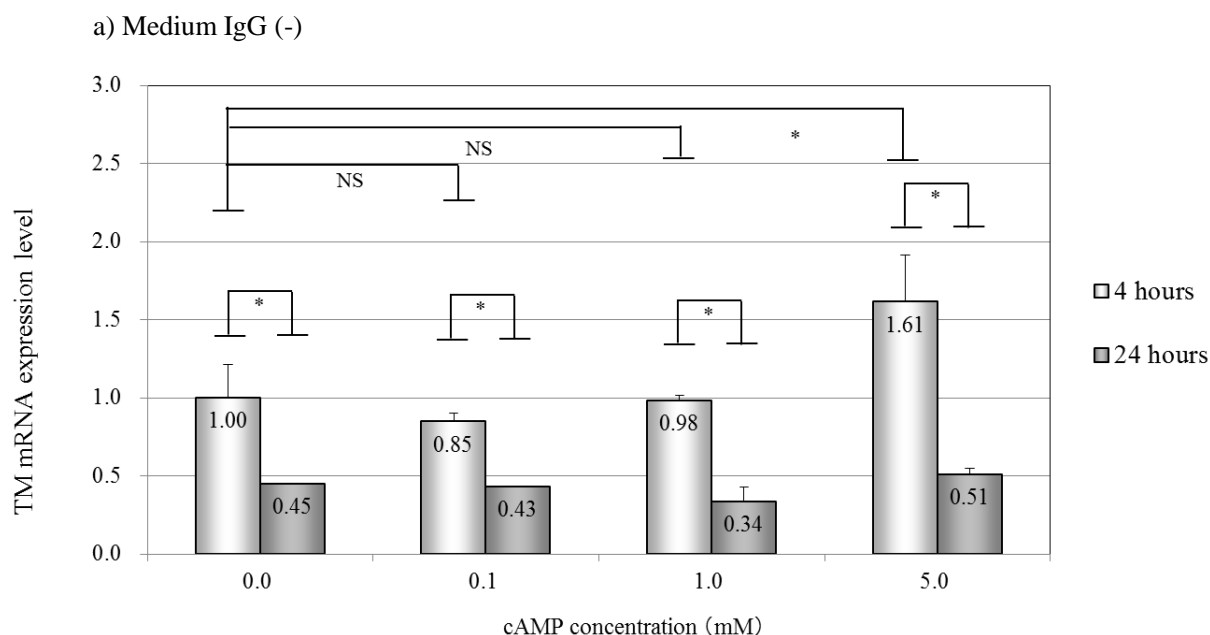


Figure 38. The relationship between TF mRNA expression level and cAMP concentration

HUVEC were cultured with normal IgG, LA IgG, or Medium IgG (-) as reference for 4 or 24 hours with 0, 0.1, 1.0 or 5.0 mM cAMP. mRNA level of Medium IgG (-) for 4hours incubation was established as standard, and the other mRNA levels were calculated as relative values. Each sample was assayed in triplicate (n=3). The bars indicate SD. *Statistically significant ($p < 0.05$). NS, not significant.

(10) HUVEC への cAMP 添加による TM の発現量の変化

TF の mRNA 発現量を比較した条件で, TM の mRNA 発現量と cAMP 濃度の関係を経時的に比較した (Figure 39). Medium IgG (-) で 4 時間培養の条件下での TM の mRNA 発現量を 1.0 としたときの, cAMP 0, 0.1, 1.0, 5.0 mM の mRNA 発現量を算出した. Medium IgG (-) での TM の mRNA 発現量は 4 時間培養ではそれぞれ 1.00, 0.85, 0.98, 1.61, 24 時間培養ではそれぞれ 0.45, 0.43, 0.34, 0.51 であり, 4 時間培養の cAMP 5.0 mM の条件は 0 mM よりも mRNA 発現量が有意に高値を示した. また, 4 時間と 24 時間培養の比較ではいずれの cAMP 濃度でも mRNA 発現量に有意差が認められた. cAMP の添加により, Maruyama ら⁷²⁾ の結果に従って TM の mRNA 発現量が上昇する結果が認められた. 健常人血漿の精製 IgG での TM の mRNA 発現量は 4 時間培養ではそれぞれ 0.72, 0.63, 0.75, 1.12, 24 時間培養ではそれぞれ 0.44, 0.32, 0.31, 0.53 であり, 4 時間培養では cAMP 5.0 mM の条件は 0 mM よりも mRNA が有意に高値を示した. また, 4 時間と 24 時間培養の比較ではいずれの cAMP 濃度でも mRNA 発現量に有意差が認められた. LA 患者血漿の精製 IgG での TM の mRNA 発現量は 4 時間培養では, 0.43, 0.44, 0.42, 0.74, 24 時間培養ではそれぞれ 0.40, 0.30, 0.24, 0.41 であり, 4 時間培養の cAMP 5.0 mM の条件は 0 mM よりも mRNA 発現量が有意に高値を示した. また, 4 時間と 24 時間培養後ではいずれの cAMP 濃度でも mRNA 発現量に有意差が認められた. また, 4 時間培養では Medium IgG (-), Normal IgG と比較して, すべての cAMP 濃度で mRNA の値が低値を示した.



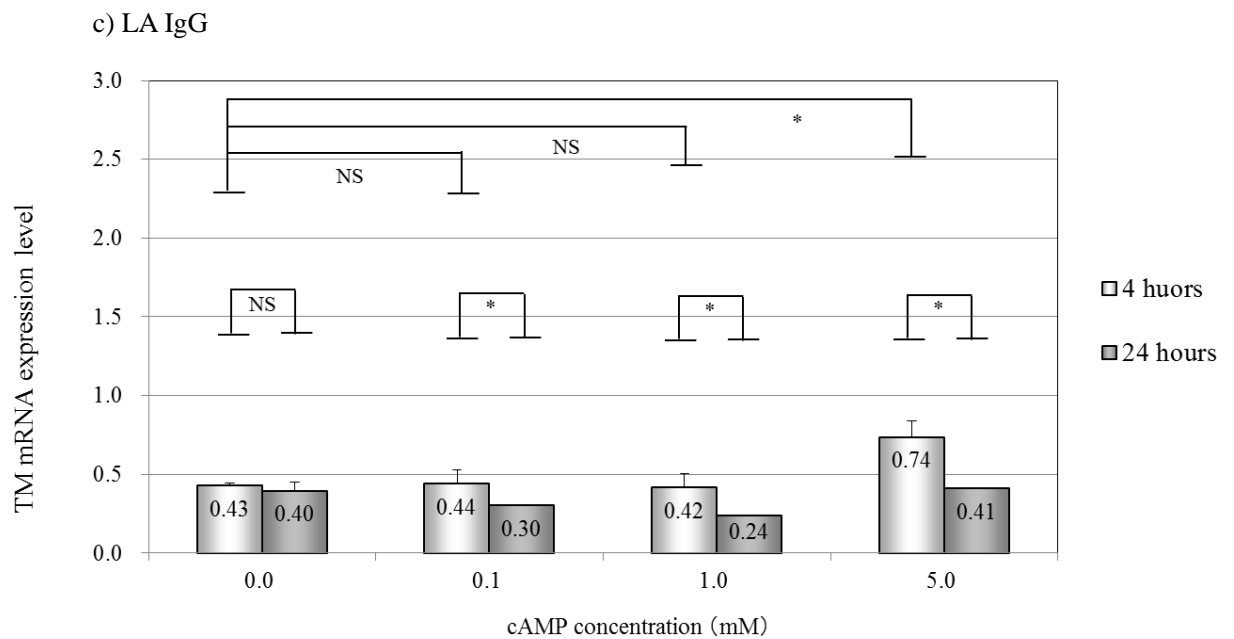
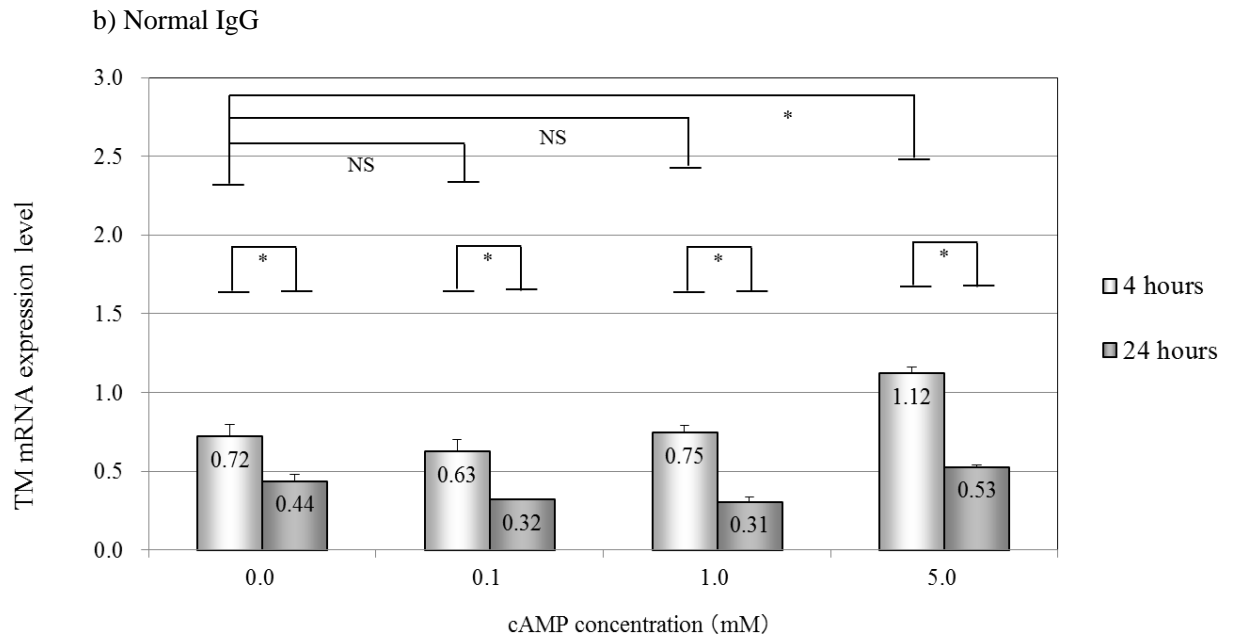
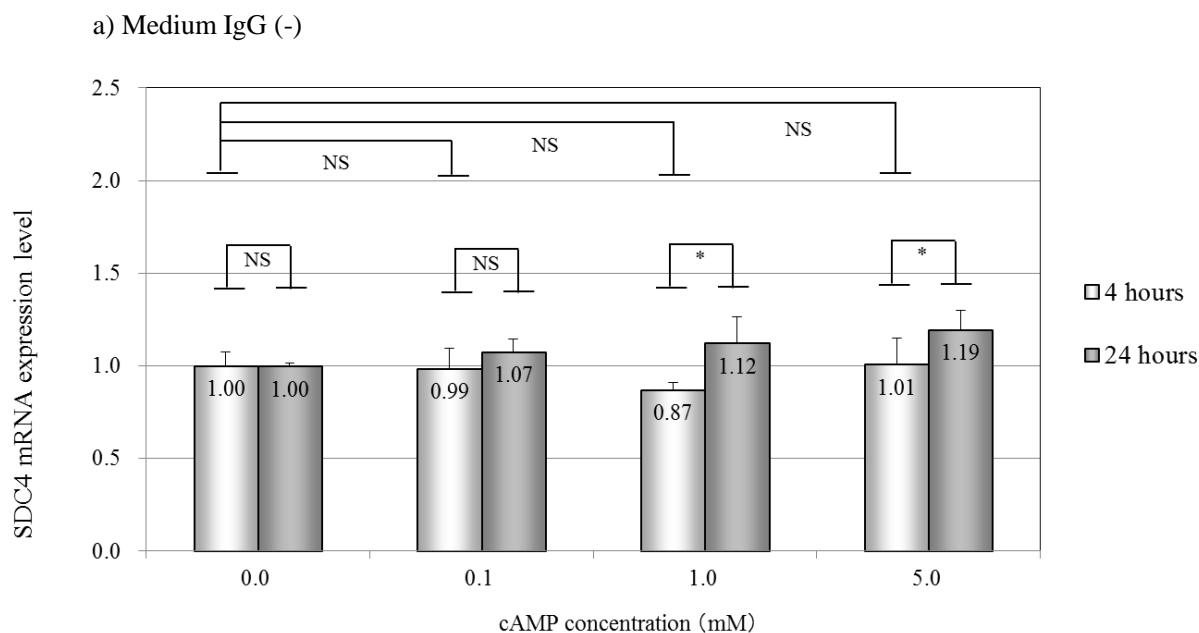


Figure 39. The relationship between TM mRNA expression level and cAMP concentration HUVEC were cultured with normal IgG, LA IgG, or Medium IgG (-) as reference for 4 or 24 hours with 0, 0.1, 1.0 or 5.0 mM cAMP. mRNA level of Medium IgG (-) for 4hours incubation was established as standard, and the other mRNA levels were calculated as relative values. Each sample was assayed in triplicate (n=3). The bars indicate SD. *Statistically significant ($p < 0.05$). NS, not significant.

(11) HUVEC への cAMP 添加による SDC4 の発現量の変化

TF, TM の mRNA 発現量を比較した条件で, SDC4 の mRNA 発現量と cAMP 濃度の関係を経時的に比較した (Figure 40). Medium IgG (-) で 4 時間培養の条件下での SDC4 の mRNA 発現量を 1.0 としたときの, cAMP 0, 0.1, 1.0, 5.0 mM の mRNA 発現量を算出した. Medium IgG (-) での SDC4 の mRNA 発現量は 4 時間培養ではそれぞれ 1.00, 0.99, 0.87, 1.01, 24 時間培養ではそれぞれ 1.00, 1.07, 1.12, 1.19 であり, cAMP 濃度による有意差は認められず, cAMP 1.0, 5.0 mM でのみ 4 時間と 24 時間培養の間で有意差が認められた. 健常人血漿の精製 IgG での SDC4 の mRNA 発現量は 4 時間培養ではそれぞれ 0.89, 0.80, 0.87, 0.81, 24 時間培養ではそれぞれ 1.15, 1.07, 1.16, 1.28 であり, Medium IgG (-) と同じく cAMP 濃度による有意差は認められず, 4 時間と 24 時間培養の間ですべての cAMP 濃度で有意差が認められた. LA 患者血漿の精製 IgG での SDC4 の mRNA 発現量は 4 時間培養では 1.53, 1.47, 1.04, 0.94, 24 時間培養ではそれぞれ 0.92, 0.81, 0.75, 0.89 であり, 4 時間培養では cAMP 1.0, 5.0 mM で 0 mM と比較して mRNA 発現量が有意に低値を示した. また, 4 時間と 24 時間培養の比較では cAMP 0, 0.1, 1.0 mM で mRNA 発現量に有意な差が認められた.



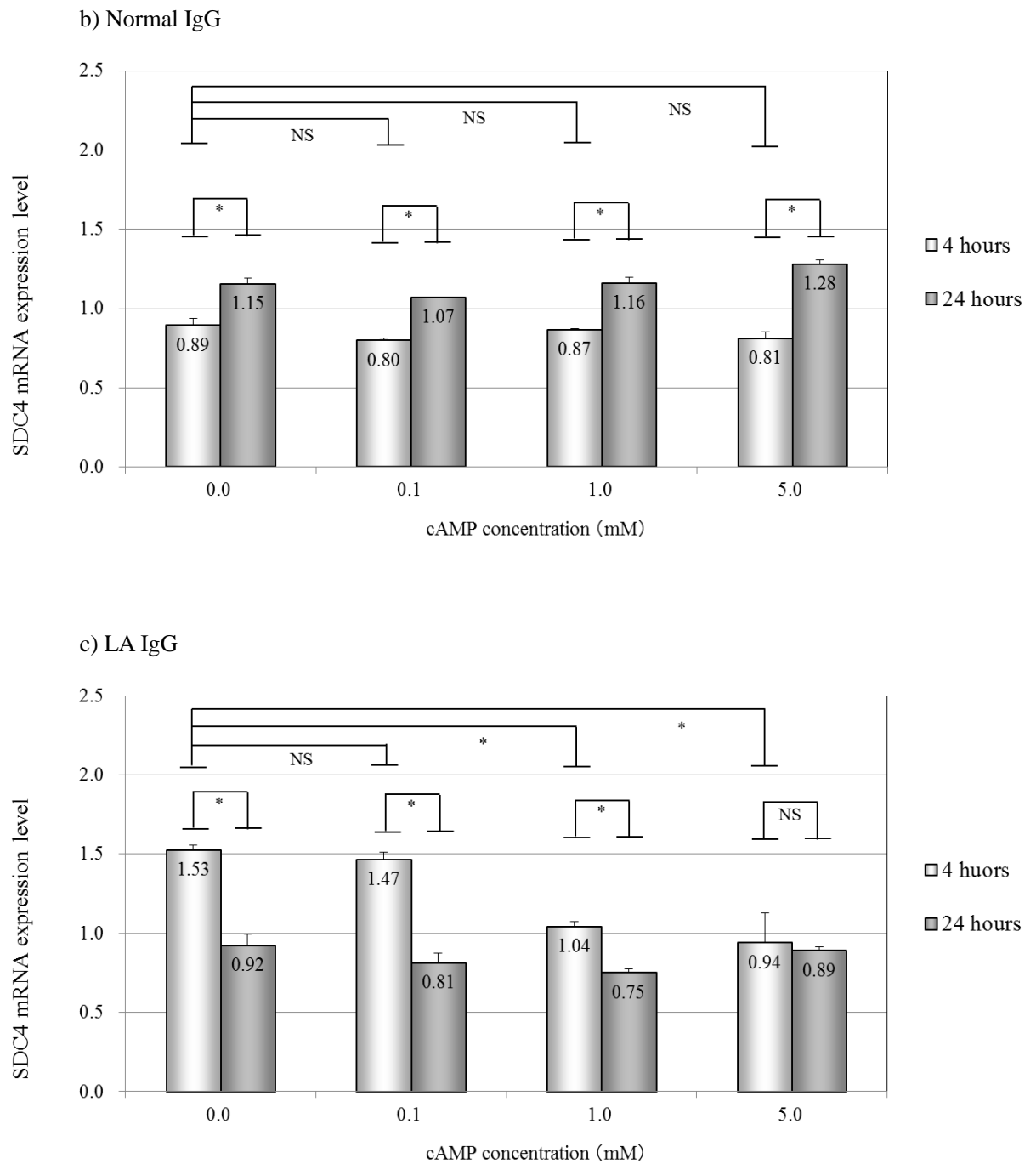


Figure 40. The relationship between SDC4 mRNA expression level and cAMP concentration
 HUVEC were cultured with normal IgG, LA IgG, or Medium IgG (-) as reference for 4 or 24 hours with 0, 0.1, 1.0 or 5.0 mM cAMP. mRNA level of Medium IgG (-) for 4hours incubation was established as standard, and the other mRNA levels were calculated as relative values. Each sample was assayed in triplicate (n=3). The bars indicate SD. *Statistically significant ($p < 0.05$). NS, not significant.

4) 考察

本章では、aPL が血管内皮細胞に与える刺激について注目し、血管内皮細胞に発現する凝固関連タンパク質の mRNA 発現量を測定し、aPL 存在下で血栓傾向を示すかを検討した。まず、APS 患者血漿と対照である健常人血漿から Hitrap protein G HP Column により IgG 精製を行った。精製時の O.D.280 の値からアプライした血漿サンプルが IgG 以外の素通り分画と IgG の溶出分画に分離できていることを確認した (Figure 30)。IgG 溶出分画を回収、透析、タンパク質濃度を調整して SDS-PAGE で純度を確認した (Figure 31)。APS 患者血漿と健常人血漿ともに非還元状態で 100 kDa 以上でブロードなバンドが認められた。還元状態では 100 kDa 以上のブロードなバンドは消失し、25 kDa と 50 kDa の位置に light chain と heavy chain の分子量と一致するバンドが検出でき、他のバンドは認められなかったことから IgG が高純度に精製されていることを確認した。精製 IgG 中には目的とする aPL 以外にも様々な IgG が含有されているため、aPL の反応性を確認するために、 β 2-glycoprotein I と陰性荷電の複合体に対する抗体の反応性を ELISA で確認した (Figure 32)。LA IgG はカットオフ値の約 10 倍の Unit 数である 108.9 Unit を示し、 β 2-glycoprotein I と陰性荷電の複合体に対する抗体が多く存在していることが確認された。一方、Normal IgG は -5.3 Unit を示し、 β 2-glycoprotein I と陰性荷電の複合体に対する抗体が存在せず、LA IgG の対照として用いて問題ない IgG であることを確認した。aPL の一つである抗 β 2-glycoprotein I 抗体の反応性が ELISA で認められたため、IgG 溶液中に含まれる他の aPL も反応性を有すると考えた。本検討では、aPL を一種類に限定せずに患者血漿中に存在する複数種類の aPL と aPL 以外の IgG の溶液を用いて健常人血漿の IgG を比較対照として検討を行った。

次に、HUVEC に aPL と LPS を添加して TF の mRNA 発現量を測定し、セカンドヒット理論の検証を行った (Figure 34)。aPL を含む LA IgG を添加した HUVEC では、TF の mRNA 発現量が Medium IgG (-) と比較して約 2.5 倍、Normal IgG と比較して約 2 倍に上昇しており、Ostertag ら¹²⁾ と同一の挙動を示す結果が得られたことを確認して基盤となる実験系を確立した。なお、Normal IgG で TF の mRNA 発現量が Medium IgG (-) と比較して約 1.3 倍になった理由は、IgG が細胞に非特異的に結合して刺激を与えたためと考えられた。本研究では、内在性コントロールとして 18s rRNA と GAPDH を比較して SD の低い 18s rRNA を採用した。GAPDH は解糖系に加えて DNA 修復や複製、さらには小泡輸送にも関与する多機能タンパク質である。本実験の HUVEC の培養条件、培地中の添加物質などが GAPDH が関与する反応系にわずかながら影響を与えることで、各 well で発現

量が異なった可能性が考えられる。また、確立した実験系で TM と SDC4 の mRNA 発現量を測定した (Figure 35, 36)。TM では、Normal IgG と LA IgG でそれぞれ 1.2, 0.7 を示し、LA IgG は Normal IgG の約 50% の発現量になっていることが示された。また、SDC4 では、Normal IgG と LA IgG でそれぞれ 1.0, 1.1 を示した。以上の結果から APS の血栓形成メカニズムの一つとして、LA IgG を介して細胞に与えられた刺激がシグナル伝達により細胞内の mRNA 発現に影響を与え、凝固抑制因子である TM のタンパク質レベルで発現を低下させて血栓症が発症する可能性が示唆された。

更に、aPL の刺激が継続的か一過性かを解明するために、HUVEC へ精製 IgG を添加して 4 時間と 24 時間培養で比較検討した (Figure 37)。TF では、4 時間培養で Medium IgG (-), Normal IgG, LA IgG の添加で mRNA 発現量が 1.00, 1.20, 2.15 に上昇するが、24 時間培養では、0.05, 0.06, 0.08 に低下した。この結果から刺激は一時的であり、TF の発現上昇は一過性と考えられた。TF はずり応力などの物理的刺激でも一時的に mRNA 発現量が上昇することが報告されている。⁵⁷⁾ 本実験系では意図的なずり応力の負荷はないが、添加成分である LPS, β 2-glycoprotein I に加えてこれらの培地成分を添加する際に培地に流体力学的な応力が生じて、それが物理的刺激となり HUVEC を刺激して TF の mRNA が発現上昇した可能性が考えられる。よって、4 時間では添加時に生じる物理的刺激により発現上昇したが、24 時間静置後では物理的刺激が無い状況が長く続いたため発現が減少し、一過性の発現上昇になったと考えられる。また、TM では 4 時間培養で Medium IgG (-), Normal IgG, LA IgG の添加で mRNA 発現量が 1.00, 0.72, 0.43 であり、24 時間培養では 0.45, 0.44, 0.40 であった。LA IgG 添加による TM の mRNA 発現量の低下は 4 時間培養では認められたが、24 時間培養では認められず、4 時間と 24 時間培養で Medium IgG (-) を添加した条件でも発現量が 45% に低下した。TM の mRNA 発現量は刺激物質に応じて、刺激から 24 時間継続的に発現変化を認める場合と刺激が一過性で 24 時間後に添加前の発現量となる場合がある。^{88, 89)} 4 時間培養で発現減少し、24 時間培養で変化が認められなくなったため、本実験系では aPL は一過性に TM の mRNA 発現量に影響を与えたと考えられた。SDC4 では 4 時間培養の Medium IgG (-), Normal IgG, LA IgG の添加で mRNA 発現量が 1.00, 0.89, 1.53 であり、24 時間培養では 1.00, 1.15, 0.92 であった。4 時間と 24 時間培養で Medium IgG (-) を添加した条件で mRNA 発現量が同等レベルであり、SDC4 は TF や TM のように刺激がシグナルとなって mRNA 発現量が変化することがなく、シグナル伝達系が異なると考えられた。4 時間培養では LA IgG 添加により凝固抑制因子である SDC4 の mRNA 発現量は上昇し、仮説に反して抗血栓傾向を示した。

しかし、タンパク質レベルでは、緒言に示した通り β 2-glycoprotein I 依存性の aPL が SDC4 と β 2-glycoprotein I の複合体に結合することで、SDC4 の抗凝固作用が複合体形成により阻害されることが報告されている (Figure 25).⁵⁷⁾ 本実験結果では LA IgG の添加で SDC4 の mRNA 発現量の低下は認められなかったため、SDC4 は mRNA ではなく既報通りタンパク質レベルで aPL の阻害を受けて、血栓傾向を示すと考えられた。

HUVEC を含め血管内皮細胞は絶えず血流に接触し、生体内では必ずり応力の負荷がかかる。必ずり応力は凝固・抗凝固因子にも影響を与えることが示されており、HUVEC は必ずり応力の負荷環境下では TM の mRNA 量が約 3 倍に発現上昇することが示されている。⁶⁶⁾ 本実験では、Maruyama ら⁷²⁾ の方法に従い、dibutyl cAMP を HUVEC に添加することで TM の mRNA を発現上昇させて aPL が各 mRNA 発現量に与える影響を検討した (Figure 38-40)。Maruyama ら⁷²⁾ は cAMP を 3 mM 添加して TM の発現量を 2 ~ 3 倍に上昇させたため、本実験でも cAMP 濃度を 0, 0.1, 1.0, 5.0 mM として検討を行った結果、5.0 mM cAMP では 0 mM と比較して TM の発現量が 1.6 倍に有意に上昇して傾向が再現した。Maruyama ら⁷²⁾ の結果よりも mRNA 発現量が劣るが、これは培養液成分の違いなどの影響が考えられる。4 時間培養の条件における TF の mRNA 発現量は、LA IgG を添加した系では cAMP 0.1, 1.0, 5.0 mM で 0 mM と比較して mRNA 発現量の有意な低下が認められた。また cAMP 濃度が 1.0 と 5.0 mM の条件では Meidium IgG (-), Normal IgG と同等レベルの発現量であった。これまで LA IgG は血管内皮細胞を刺激することで TF の mRNA 発現量を上昇させて、血栓傾向になる可能性が指摘されていた。^{11, 12)} しかし、生体内では血管内皮細胞には常に必ずり応力がかかり、その物理的刺激からアデニル酸シクラーゼを介したシグナル伝達により cAMP が高値となることで転写因子が制御される可能性が考えられる。今回の実験で、cAMP 高値では LA IgG を添加した系でも TF の mRNA 発現量が Medium IgG (-), Normal IgG と同等レベルであったことから、生体内で cAMP が高濃度条件下では LA IgG の刺激は TF の mRNA 発現量の上昇には関与せず、血栓形成の直接的な要因にならない可能性が考えられた。また、培養時間の比較では、24 時間培養では 4 時間と比較してすべての cAMP 濃度で mRNA 発現量が有意に低値であったことから、4 時間培養では LPS, β 2-glycoprotein I, 添加時の物理的刺激などにより TF が一過性に上昇していると考えられ、LA IgG が生体内で TF を恒常的に発現上昇させている可能性は低いと思われた。この結果は LPS の刺激で誘導された TF mRNA の turn-over は非常に早くわずか数時間で消失する既報の結果と一致する。⁵⁰⁻⁵²⁾ なお、24 時間培養における cAMP 5.0 mM の条件では 0, 0.1, 1.0 mM の条件と比較して TF の mRNA 発現量が

約 4 倍程度であった。この理由としては、cAMP 5.0 mM の高濃度では上述の TF mRNA の turn-over の影響が 0, 0.1, 1.0 mM の場合と比較して異なってくる可能性が考えられる。TM の 5.0 mM cAMP で LA IgG を添加した系では、mRNA 発現量が Medium IgG (-), Normal IgG よりも低値を示し、特に Normal IgG との比較では約 40% の低下が認められた。生体内では LA IgG の刺激により凝固抑制因子である TM の mRNA 発現量が低下することで、血栓形成を十分に抑制することができず、血栓症を発症すると考えられた。SDC4 では 0 と 0.1 mM cAMP で LA IgG を添加した系では、mRNA 発現量が Medium IgG (-), Normal IgG と比較して約 1.5 倍に上昇しているが、5.0 mM cAMP では Medium IgG (-), Normal IgG と同等レベルであり、生体内では LA IgG の刺激は SDC4 の mRNA 発現量に関与していないと考えられた。また、上述の通り SDC4 は抗凝固作用がタンパク質レベルで阻害されることで血栓傾向を示すため、mRNA レベルでの影響は受けない可能性が高いと考えられた。⁵⁷⁾

本章で得られた結果から考えられる aPL の生体内での血栓形成機序を示す (Figure 41-43)。健常人では、出血時などに TF をトリガーとした凝固反応が促進されてトロンビンが生成し、フィブリノーゲンがフィブリンに変換されて血栓が形成されて止血作用が進む。それと同時に、過剰な血栓が生じないように TM がトロンビンの生成を阻害する。つまり、健常人では凝固促進因子である TF と凝固抑制因子である TM の発現量のバランスが取れている状態にある (Figure 41)。APS 患者が血栓症を発症するメカニズムとして、Ostertag ら¹²⁾ は、aPL が血管内皮細胞に作用することで、TF の mRNA 発現上昇を介してタンパク質の発現量が上昇することで凝固反応のバランスが崩れて過剰のトロンビンが生成し、そのトロンビンが過剰のフィブリンを生成することで血栓症を引き起こすと考えていた (Figure 42)。しかしながら、Ostertag ら¹²⁾ はずり応力が細胞に与える影響を考慮しておらず、生体内を反映していないと考えられる。本研究では、ずり応力により TM の mRNA 発現上昇を介してタンパク質の発現量が上昇する可能性を考慮し、cAMP により mRNA 発現量を上昇させた。その結果、aPL を添加した系では、TF の mRNA 発現量に変化は認められず、一方で凝固抑制因子である TM の mRNA 発現量の低下が認められた。従って、APS 患者が血栓症を発症するメカニズムとして TM の mRNA 発現低下を介したタンパク質レベルの発現低下により過剰のトロンビンが生成し、過剰のフィブリンが血栓症を引き起こすと可能性が示唆された (Figure 43)。

本研究の限界について以下に示す。培養時間を 4 時間と 24 時間で行い、シグナルが一過性か継続的を検討した。TF の mRNA 発現量は 4 時間と比較して 24 時間では 5% ま

で低下しており、一過性と考えられた。aPL を添加して mRNA 発現量を測定した研究の多くは培養時間を 4 時間で検討しており、本研究も既報に従い培養時間を 4 時間として検討した。4 時間よりも短い時間、または 6 時間などにするにより詳細な発現の変化を把握できる可能性がある。ただし、生体内では常に aPL が循環しているため *in vivo* では状況に応じて継続的に TF がタンパク質レベルで発現上昇している可能性も考えられ、実験的な限界が存在すると思われる。さらに、TM はずり応力で mRNA の発現が上昇することが報告されている。実験系の構築上、ずり応力をかけて検討を行うことは極めて困難であったため、本研究では mRNA を発現上昇させるために cAMP を用いた。Maruyama ら⁷²⁾ の方法に基づき cAMP 濃度を 0, 0.1, 1.0, 5.0 mM の濃度に設定して添加することで、ずり応力を負荷した場合と同様に TM の mRNA 発現を上昇させることができ、さらに aPL による TM の抑制が認められた。しかし、生体内での TM の発現制御機構は明確になっておらず、cAMP 以外のシグナルにより TM の発現が調節されている可能性がある。また、本実験における cAMP 0.1, 1.0, 5.0 mM の TM 発現量は 4 時間と 24 時間培養の比較で有意に mRNA が減少した。上述の通り、生体内では常に aPL が循環しているため *in vivo* では状況に応じて継続的に TM の発現が本実験結果の mRNA のように減少しない可能性も考えられる。更に、ずり応力の負荷が加わった際の血管内皮細胞内の cAMP の濃度も十分には明確になっていない。ずり応力、シグナル伝達、TM の発現制御に関してはまだまだ不明な点が多く、今後の解明が期待される。本研究では、TF, TM, SDC4 の mRNA 発現量の変化から血栓傾向を示すかを検討した。mRNA 発現レベルとタンパク質の発現量レベルは必ずしも一致しないが、TF, TM, SDC4 では mRNA 発現レベルがタンパク質発現レベルや活性に対応することが示唆されている。^{16, 53, 72, 91)} 今回の検討では mRNA の検出のみを行い、タンパク質レベルでの検討は実施していないが、TF, TM, SDC4 の mRNA 発現レベルはタンパク質発現レベルと挙動が一致する傾向にあり、mRNA 発現レベルの変化からタンパク質発現レベルを考察しても問題ないと考えられる。

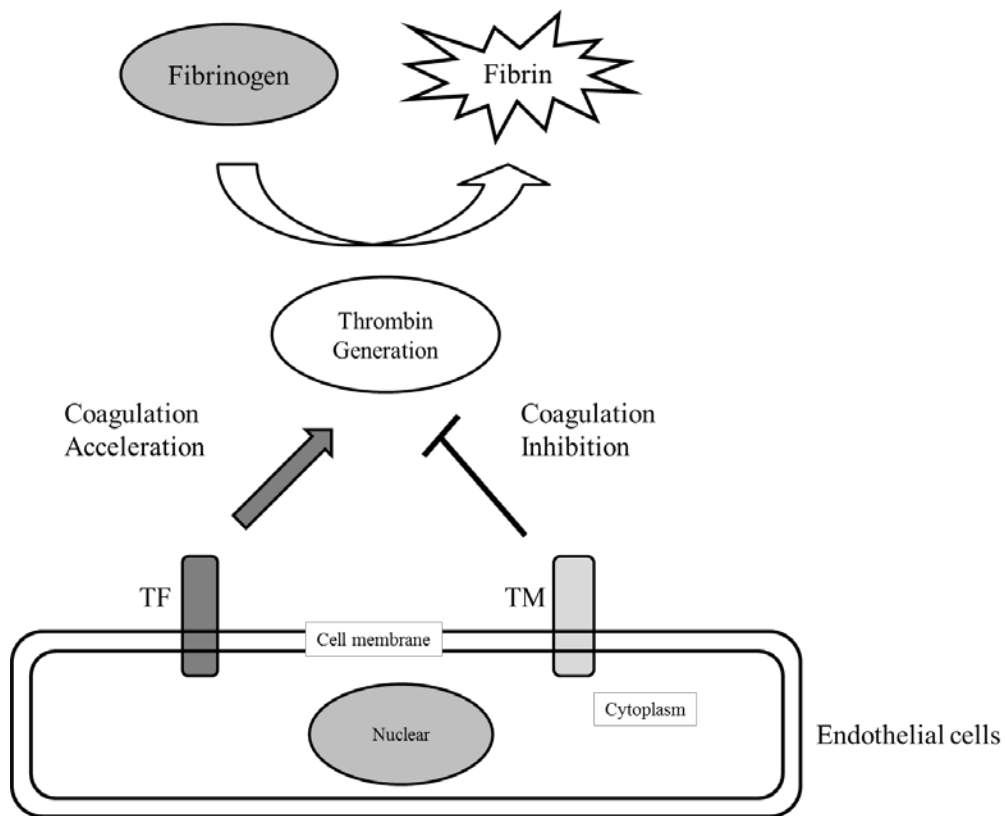


Figure 41. Coagulation reaction in healthy person

When bleeding happens, TF accelerates coagulation reaction and generates thrombin through coagulation cascade. Thrombin activated by TF converts fibrinogen into fibrin. Finally, fibrin makes the clot and stops the bleeding. On the other hand, TM inhibits thrombin generation, and suppresses coagulation cascade. In normal person, TF and TM regulate the coagulation cascade, and they are balanced. The detail mechanism in coagulation cascade of TF and TM was shown in figure 3 and 4, respectively.

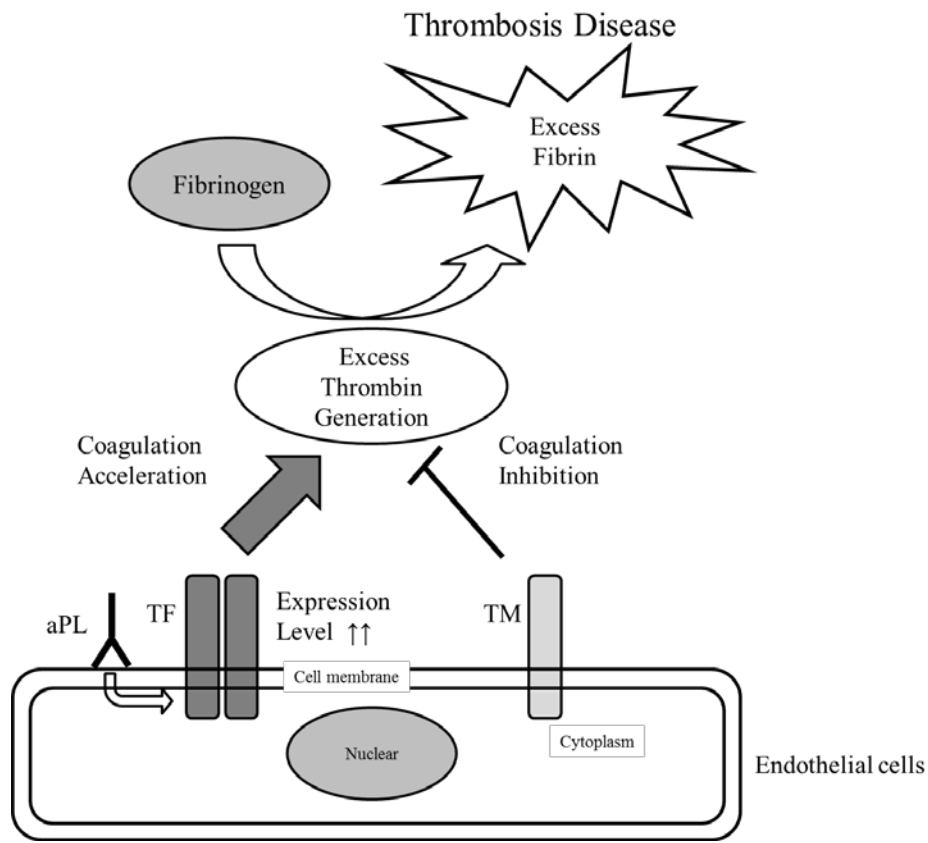


Figure 42. Thrombosis mechanism of APS patient (Current Model)

The current thrombosis mechanism model in antiphospholipid syndrome patients suggests that aPL induces significant increase in TF mRNA expression. Once TF accelerates coagulation reaction, thrombin is generated excessively. As a result, the excess fibrin generated by thrombin is related to thrombosis. Though TM inhibits thrombin generation, TM is not enough to suppress the coagulation reaction.

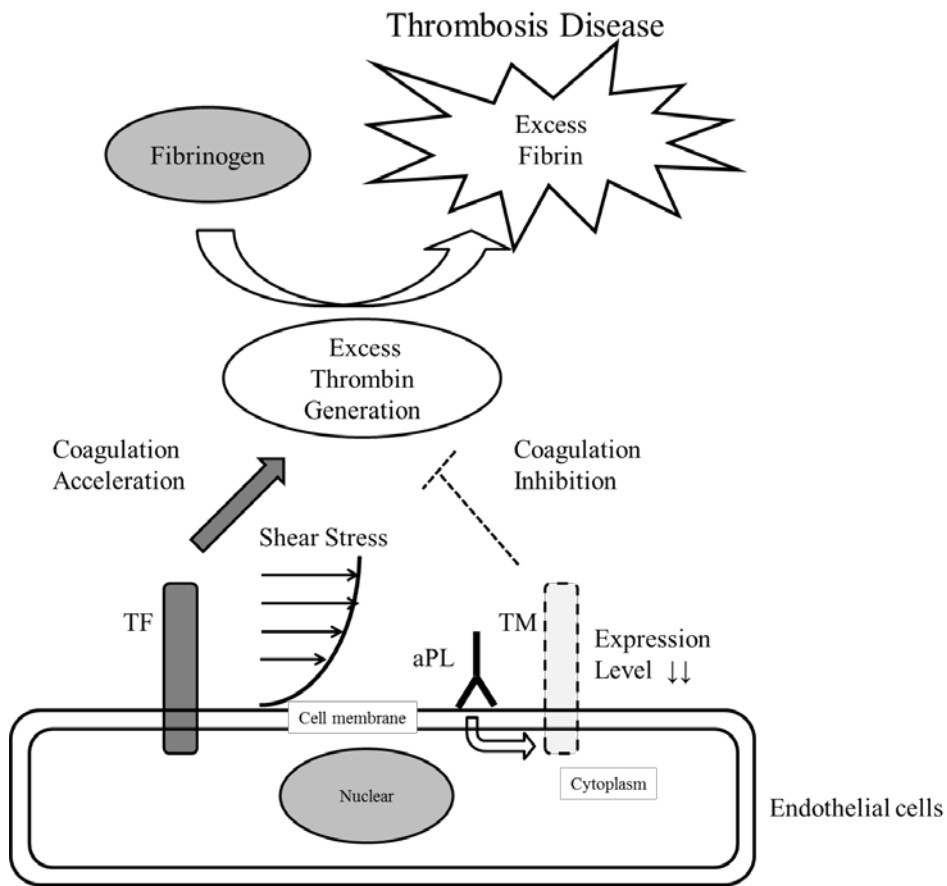


Figure 43. Thrombosis mechanism of APS patient in this study (New Model)

The new model suggests that aPL decreases TM mRNA expression significantly, and thrombin is generated excessively. As a result, the excess fibrin generated by thrombin is related to thrombosis.

APS の臨床症状は凝固亢進を意味する血栓症にも関わらず、検査所見の一つである LA は APTT の凝固時間延長である出血を意味し、APS では *in vivo* の反応である臨床症状と *in vitro* の反応である臨床検査で相反する凝固反応が起こる。*in vitro* では凝固反応に関与するリン脂質が APTT 試薬中に限られるため、LA は活性化された凝固因子とリン脂質の複合体に結合することでリン脂質依存性の凝固反応を阻害して凝固時間を延長させる。APTT 試薬中のリン脂質濃度が低濃度であるほど LA が凝固反応を阻害し、凝固時間の延長が認められる。*in vivo* では血管内皮細胞や血小板の細胞膜など多くのリン脂質が存在して無数の凝固反応が起き、LA による阻害を受けずに多くの凝固反応が亢進するため、凝固反応が阻害されることで出血を呈することはない。LA は血管内皮細胞の細胞膜に β 2-glycoprotein I などのタンパク質を介して結合し、LA の結合が刺激となって血管内皮細胞内にシグナルが伝達され、凝固関連因子の mRNA 発現量が凝固亢進に変化して血栓症を発症する。変化する mRNA の一つとして TM の発現減少があり、それに加えて感染症などによる LPS 濃度上昇、cAMP 濃度上昇がある場合に血栓症を高確率で発症すると考えられる。

結論として、本章では APS 患者が血栓症を発症するメカニズムに関して新たな知見を見出した。*in vivo* で aPL が血管内皮細胞に与える影響を把握することは、APS 患者の治療を検討する上で極めて重要であり、本研究結果をもとに新たな治療方法や診断方法が考案され、患者 QOL の向上に大きく寄与すると期待される。

総括

本研究では、第 1 章で抗リン脂質抗体の責任抗体の 1 つとして考えられている LA のスクリーニングで有用な APTT 試薬の条件と最適なカットオフ値について検討し、第 2 章で抗リン脂質抗体によって引き起こされる血栓形成機序の解明として、血管内皮細胞に発現する凝固関連因子の mRNA 発現量の変化を測定し、以下の知見を得た。

第 1 章

1) LA スクリーニングに有用な APTT 試薬の検討を行った。リン脂質を同一条件とした場合、エラグ酸を活性化剤とする試薬は、シリカを活性化剤とする試薬と比較して LA への反応性が高い結果が得られ、LA を検出する試薬として十分な反応性を有していることが明らかとなった。APTT 試薬の LA に対する反応性は、活性化剤に依存せずにリン脂質濃度に依存すると考えられた。

2) APTT による LA 検査方法として推奨される ICA のカットオフ値の検討を行った。LA 陰性検体群の 95 パーセントイルの上限値をカットオフ値として算出した感度は、すべての試薬で他のカットオフ値から算出した感度よりも高い結果が得られた。また、特異度は 98 ~ 100% の範囲内であり、有用性が高いと考えられた。

3) APTT 延長を示すワルファリン検体群、ヘパリン検体群、血友病検体群で ICA を算出し、健常人検体、LA 陽性検体群と比較した。ICA は LA 陽性検体群を健常人検体群、ワルファリン検体群、血友病検体群と鑑別可能であり、LA の診断に有用と考えられた。ただし、ヘパリン検体群では特に高濃度検体において明確な鑑別は困難であった。また、ROC 解析から算出した 4 試薬のカットオフ値の最適値は 10.4 ~ 13.6 の範囲であったため、10 ~ 14 の範囲で試薬共通のカットオフ値を設定することが有用と考えられた。

第 2 章

1) APS 患者が血栓症を発症するメカニズムとして、従来、aPL が血管内皮細胞に作用することで、TF の mRNA 発現上昇を介してタンパク質レベルで発現上昇して過剰のトロンビンが生成し、過剰のフィブリンが血栓症を引き起こすと考えられてきた。しかし、生体内のずり応力を cAMP で再現した条件下では、TF の mRNA 発現上昇は認められず、血栓形成に大きく関与していない可能性が考えられた。

2) 生体内のずり応力を cAMP で再現した条件下では、LA IgG の刺激により凝固抑制因子である TM の mRNA 発現低下を介してタンパク質レベルで発現低下することで、血栓形成を十分に抑制することができず、血栓症を発症するメカニズムが考えられた。

3) 生体内では、LA IgG の刺激は SDC4 の mRNA 発現量に大きな影響は与えず、 β 2-glycoprotein I 依存性の aPL が結合して、抗凝固作用がタンパク質レベルで阻害されることが考えられた。

謝辞

本研究に際して、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道医療大学 薬学部 分子生命科学講座 青木隆教授に心より深く感謝致します。

研究全般に渡り格別の御指導、御鞭撻を頂き、また、凝固反応と抗リン脂質抗体症候群の基礎的知識から臨床的知識まで幅広く御教授頂きました北海道医療大学 歯学部 内科学講座 家子正裕教授に心より深く感謝致します。また、実験にあたり、数々の御助言と御指導を賜りました北海道医療大学 歯学部 内科学講座 高橋伸彦准教授、北海道医療大学病院 臨床検査部 内藤澄悦先生、吉田美香先生に心より感謝致します。カンファレンスを通じて有益な御助言を頂きました北海道医療大学 歯学部 生化学講座 荒川俊哉講師、北海道医療大学 歯学部 歯科麻酔科学講座 金澤香助教、北海道医療大学 歯学部 クラウンブリッジ・インプラント補綴学講座 油井知雄助手、赤沼正康先生に感謝致します。

本研究の機会を与えて頂きましたシスメックス株式会社 凝固プロダクトエンジニアリング本部 神田博執行役員、松尾直彦部長、高岡秀成課長、山口温輝課長、井関蔵吉主任技師に厚く御礼申し上げます。

最後に、良いディスカッションをさせて頂いた鈴木健史さん、終始暖かいご支援を頂きました寿楽弘子さん、石田弥生さん、そして北海道医療大学 歯学部 内科学講座、および、シスメックス株式会社の皆様に感謝致します。

平成 27 年 3 月

熊野 穰

引用文献

- 1) 北島勲. 日本血栓止血学会誌, **19**, 462-466 (2008) .
- 2) 森田隆司. 心臓, **41**, 181-189 (2009) .
- 3) Hughes GRV. *Lancet*, **342**, 341-344 (1993) .
- 4) 吉田美香, 内藤澄悦, 垂水隆志, 中林透, 家子正裕, 渥美達也, 小池隆夫. 日本検査血液学会雑誌, **9**, 69-76 (2008) .
- 5) 表美香, 高道小百合, 吉田知孝. 日本検査血液学会雑誌, **9**, 77-85 (2008) .
- 6) 内藤澄悦, 家子正裕, 吉田美香, 垂水隆志, 中林透, 西尾仁, 渥美達也. 臨床病理, **56**, 195-202 (2008) .
- 7) 山崎哲, 鈴木典子, 後藤宏実, 高山成伸. 生物資料分析, **32**, 365-370 (2009) .
- 8) Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K, Koike T. *Arthritis Rheum*, **42**, 167-174 (1999) .
- 9) Ieko M, Ichikawa K, Atsumi T, Takeuchi R, Sawada K, Yasukouchi T, Koike T. *Semin Thromb Hemost*, **26**, 85-90 (2000) .
- 10) 内藤澄悦, 家子正裕, 武田美香, 渥美達也, 小池隆夫. 臨床病理, **48**, 540-546 (2000) .
- 11) Dobado-Berrios P. M, Lopez-Pedreira C, Velasco F, Aguirre M.A, Torres A, Cuadrado M. *Thromb Haemost*, **82**, 1578-1582 (1999) .
- 12) Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris E. N, Pierangeli S. S. *Arthritis Rheum*, **52**, 1545-1554 (2005) .
- 13) Suzuki K, Kusumoto H, Deyashiki Y, Nishioka J, Maruyama I, Zushi M, Kawahara S, Honda G, Yamamoto S, Horiguchi S. *EMBO*, **6**, 1891-1897 (1987) .
- 14) Wouwer M, Collen D, Conway E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1374-1383 (2004) .
- 15) Weiler H, Isermann B.H. *J Thromb Haemost*, **1**, 1515-1524 (2003) .
- 16) Woods A, Couchman J.R. *Cur Opin Cell Biol*, **13**, 578-583 (2001) .
- 17) Brandt J.T, Triplett D.A, Musgrave K, Orr C. *Arch Pathol Lab Med*, **111**, 120-124 (1987) .
- 18) Denis-Magdelaine A, Flahault A, Verdy E. *Haemostasis*, **25**, 98-105 (1995) .
- 19) Stevenson K.J, Easton A.C, Curry A, Thomson J.M, Poller L. *Thromb Haemost*, **55**, 250-258 (1986) .
- 20) Kelsey P.R, Stevenson K.J, Poller L. *Thromb Haemost*, **52**, 172-175 (1984) .
- 21) Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand J.H, Ortel T.L, Galli M, De Groot P.G, Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardization Committee of

- the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*, **7**, 1737-1740 (2009) .
- 22) Tripodi A, Biasiolo A, Chantarangkul V, Pengo V. *Clin Chem*, **49**, 1608-1614 (2003) .
- 23) Jennings I, Kitchen S, Kitchen D.P, Woods TA, Walker ID. *J Thromb Haemost*, **9**, 2117-2119 (2011) .
- 24) 奥田昌宏, 菊川紀弘, 上村八尋. 日本検査血液学会雑誌, **3**, 124-131 (2002) .
- 25) Okuda M, Kikukawa N, Fujikawa Y, Uemura Y, Yokoyama K. *Clin Chem*, **46**, A135 (2000) .
- 26) Charles L.A, McGlasson D.L, Hawksworth B.A, Ashcraft J.H, Ortel T.L. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **5**, 601-604 (1994) .
- 27) Triplett D.A, Barna L.K, Unger G.A. *Thromb Haemost*, **70**, 787-793 (1993) .
- 28) Rauch J, Tannenbaum M, Neville C, Fortin P.R. *Thromb Haemost*, **80**, 936-941 (1998) .
- 29) Rauch J, Tannenbaum M, Janoff A.S. *Thromb Haemost*, **62**, 892-896 (1989) .
- 30) Rosner E, Pauzner R, Lusky A, Modan M, Many A. *Thomb Haemost*, **57**, 144-147 (1987) .
- 31) Ratnoff O.D, Crum J.D. *J Lab & Clin Med*, **63**, 359-377 (1964) .
- 32) Margolis J. *J Physiol*, **144**, 1-22 (1958) .
- 33) Rozen L, Copette F, Noubouossie D.F, Demulder A. *Clin Lab*, **59**, 921-924 (2013) .
- 34) Ruffatti A, Olivieri S, Tonello M, Bortolati M, Bison E, Salvan E, Facchinetti M, Pengo V. *J Thromb Haemost*, **6**, 1693-1696 (2008) .
- 35) Kitchen S, Cartwright I, Woods T.A.L, Jennings I, Preston F.E. *Br J Haematol*, **106**, 801-808 (1999) .
- 36) Van den Besselaar A.M.H.P, Neuteboom J, Bertina R.M. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **4**, 895-903 (1993) .
- 37) Stevenson K.J, Easton A.C, Thomson J.M, Poller L. *Thromb Haemost*, **50**, 601-603 (1983) .
- 38) Stevenson K.J, Easton A.C, Curry A, Thomson J.M, Poller L. *Thromb Haemost*, **55**, 250-258 (1986) .
- 39) Barrowcliffe T.W, Gray E. *Thromb Haemost*, **46**, 634-637 (1981) .
- 40) Shetty S, Ghosh K, Mohanty D. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **14**, 493-497 (2003) .
- 41) Lawrie A.S, Kitchen S, Purdy G, Mackie I.J, Preston F.E, Machin S.J. *Clin Lab Haematol*, **20**, 179-186 (1998) .
- 42) 大久保昭行. 本内科学会雑誌, **82**, 9-13 (1993) .
- 43) 三宅一徳. 日本内科学会雑誌, **94**, 2467-2472 (2005) .
- 44) 三宅一徳. 臨床検査, **40**, 1409-1413 (1996) .

- 45) 松尾収二. 臨床病理, **42**, 585-590 (1994) .
- 46) Hirsh J, Raschke R. *CHEST*, **126**, 188S-203S (2004) .
- 47) White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in Hemophilia. *Thromb Haemost*, **85**, 560 (2001) .
- 48) Thom J, Ivey L, Eikelboom J. *J Thromb Haemost*, **1**, 2689-2691 (2003) .
- 49) Martinuzzo M.E, Cerrato G.S, Varela M.L.I, Forastiero R.R. *Int J Lab Hematol*, **34**, 208-213 (2012) .
- 50) 中村伸. Annual Review 血液, 209-221 (1993) .
- 51) Broze GJ, Leykam JE, Schwartz BD. *J Biol Chem*, **260**, 10917-10920 (1987) .
- 52) Gregory SA, Morissey JH, Edgington TS. *Mol Cell Biol*, **9**, 2752-2755 (1989) .
- 53) Steffel J, Luscher TF, Tanner FC. *Circulation*, **113**, 722-731 (2006) .
- 54) 中村伸, 小口淳. 血液・腫瘍科, **32**, 68-78 (1996) .
- 55) 一瀬白帝. 図説 血栓・止血・血管学 - 血栓症制圧のために - 中外医学社 (2005) .
- 56) Sturm U, Luther T, Albrecht S. *Virchows Arch*, **421**, 79-86 (1992) .
- 57) Meroni P.L, Borghi O, Raschi E, Tedesco F. *Nat Rev Rheumatol*, **7**, 330-339 (2011) .
- 58) 石井秀美. 聖マリアンナ医科大学雑誌. **31**, 409-422 (2003) .
- 59) Conway EM, Wouwer VM, Pollefeyt S. *J Exp Med*, **196**, 565-77 (2002) .
- 60) Horie S, Ishii H, Hara H, Kazama M. *J Biochem*, **301**, 683-91 (2004) .
- 61) Giddings JC. Thrombin, thrombomodulin and the control of hemostasis. 1st ed. Austine: Landes Company, 121-41 (1994) .
- 62) Kazama M. *Acta Haematol Jpn*, **51**, 1387-1394 (1988) .
- 63) Amano K, Takeyama M. Inaba H. *Thromb Haemost*, **68**, 404-406 (1992) .
- 64) 鈴木宏治. 血栓止血誌. **20**, 9-11 (2009) .
- 65) 羽室強. 血栓止血誌. **13**, 80-84 (2002) .
- 66) 川合陽子, 松本豊, 池田康夫, 渡邊清明. 臨床病理, **45**, 315-320 (1997) .
- 67) Jaffe EA, Hematology, MacGraw-Hill Inc, 1322-1337 (1990) .
- 68) Ando J, Kamiya A. *Frontiers Med Biol Engng*, **5**, 245-264 (1993) .
- 69) Reinhart WH. *Experienta*, **50**, 87-93 (1994) .
- 70) McIntire LV. *Ann Biomed Eng*, **22**, 2 (1994) .
- 71) Traub O, Berk B.C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 677-685 (1998) .
- 72) Maruyama I, Soejima Y. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **598**, 538-539 (1990) .

- 73) Sohn R.H, Deming C.B, Johns D.C, Champion H.C, Gardner K, Rade J.J. *Blood*, **105**, 3910-3917 (2005) .
- 74) 上代淑人. シグナル伝達 - 生命システムの情報ネットワーク - メディカルサイエンスインターナショナル社 (2004) .
- 75) Cesarman-Maus G, Rios-Luuna N.P, Deora A.B, Huang B, Villa R, Cravioto M.D.C, Alarcon-Segovia D, Sanchez-Guerrero J, Hajjar K.A. *Blood*, **107**, 4375-4382 (2006) .
- 76) Mackworth-Young C.G. *Clin Exp Immunol*, **136**, 393-401 (2004) .
- 77) Simantov R, LaSaia J.M, Lo S.K, Gharavi A.E, Sammaritno L.R, Salmon J.E, Silverstein R.L. *J Clin Invest*, **96**, 2211-2219 (1995) .
- 78) Papa N.D, Sala L.G.A, Buccellati C, Khamashta M.A, Ichikawa K, Koike T, Balestrieri G, Tincani A, Hughes G.R.V, Meroni P.L. *Arthritis Rheum*, **40**, 551-561 (1997) .
- 79) George J, Blank M, Levy Y, Meroni P, Damianovich M, Tincani A, Shoenfeld Y. *Circulation*, **97**, 900-906 (1998) .
- 80) Allen K.A, Fonseca F.V, Betapudi V, Willard B, Zhang J, McCrae K.R. *Blood*, **119**, 884-893 (2012) .
- 81) Pierangeli S.S, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker J.H, Anderson G.L, Harris E.N. *Circulation*, **99**, 1997-2002 (1999) .
- 82) Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. *Arthritis Rheum*, **60**, 2457-2467 (2009) .
- 83) Rochemonteix B.G.D, Kobayashi T, Rosnoblet C, Lindsay M, Parton R.G, Reber G, Maistre E.D, Wahl D, Kruithof E.K.O, Gruenberg J, Moerloose P.D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 563-574 (2000) .
- 84) Takeya H, Mori T, Gabazza E.C, Kuroda K, Deguchi H, Matsuura E, Ichikawa K, Koike T, Suzuki K. *J Clin Invest*, **99**, 2260-2268 (1997) .
- 85) Zhang J, McCrae K.R. *Blood*, **105**, 1964-1969 (2005) .
- 86) Satta N, Kruithof E.K.O, Fickentscher C, Dunoyer-Geindre S, Boehlen F, Reber G, Burger D, Moerloose P.D. *Blood*, **117**, 5523-5531 (2011) .
- 87) Blank M, Asherson R.A, Cervera R, Shoenfeld Y. *J Clin Immunol*, **24**, 12-23 (2004) .
- 88) Shi J, Wang J, Zheng H, Ling W, Joseph J, Li D, Mehta J.L, Ponnappan U, Lin P, Fink L.M, Jensen M.H. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **14**, 575-585 (2003) .
- 89) Hirokawa K, Aoki N. *Biochem J*, **276**, 739-743 (1991) .

90) Thomas D.S., Kenneth J.L. *Nature Protocols*, **3**, 1101-1108 (2008) .

91) Yung S, Woods A, Chan T.M, Davies M, Williams J.D, Couchman J.R. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **15**, 1631-1633 (2001) .